



**Catarina de Oliveira  
Ferreira**

**Desenvolvimento e caracterização de filmes à base  
de proteínas do soro do leite – potencial  
funcionalização com quitosanos**



**Catarina de Oliveira  
Ferreira**

**Desenvolvimento e caracterização de filmes à base  
de proteínas do soro do leite – potencial  
funcionalização com quitosanos**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Química dos Alimentos, realizada sob a orientação científica do Doutor José António Lopes da Silva, professor auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

“A ambição é o puro senso de dever pois por si só não produz frutos realmente importantes para o ser humano, pelo contrário, os frutos verdadeiros provêm do amor e da dedicação para com as pessoas e as coisas”.

*Albert Einstein*

## **o júri**

presidente

**Prof. Dra. Ivonne Delgadillo Giraldo**  
Professora Associada com Agregação da Universidade de Aveiro

**Prof. Dra. Maria Manuela Estevez Pintado**  
Professora Auxiliar da Universidade Católica Portuguesa

**Prof. Dr. José António Lopes da Silva**  
Professor auxiliar da Universidade de Aveiro (Orientador)

## **agradecimentos**

O meu agradecimento ao Doutor José António Lopes da Silva, pela orientação do presente projecto e paciência nos momentos críticos.

Aos meus companheiros de laboratório, Sónia Regina Monteiro, Pedro Ferreira, Fabiane Oliveira, Biatriz Veleirinho, Juliana Vinholes, Maria Machado, Sílvia Petronilho e Dulce Helena, pelo apoio, amizade, incentivo e companheirismo.

Aos restantes colegas, pelo apoio e boa disposição.

À Alexandra Nunes, pela colaboração na análise de alguns dados obtidos.

Aos meus pais pela paciência, compreensão, apoio e motivação.

## palavras chave

Filmes, biopolímeros, oligoquitosanos, proteínas do soro do leite (WPI), quitosano, propriedades de barreira, propriedades mecânicas, propriedades de superfície

## resumo

O objectivo deste projecto consistiu na preparação de filmes comestíveis à base de proteínas do soro do leite (WPI) a pH 7 na presença de quitosano, como potenciais revestimentos de queijos, pois este apresenta propriedades biológicas interessantes, nomeadamente, actividade antimicrobiana. Com a incorporação deste polissacarídeo na matriz proteica, pretendia-se verificar se a sua presença provocaria uma melhoria das propriedades mecânicas e de barreira dos filmes de WPI. No entanto, uma vez que o quitosano é um polissacarídeo catiónico, chegou-se à conclusão que a mistura destes dois polímeros em solução a pH superior ao ponto isoeléctrico do WPI ( $pI \approx 5,2$ ), conduzia à precipitação dos mesmos. Deste modo, na impossibilidade de formar filmes de WPI a pH7 na presença de quitosano de massa molecular média, procedeu-se à preparação de filmes à base de quitosano e WPI a pH 3,5 nas seguintes proporções: 1:0, 6:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2 e 1:3

(quitosano:proteína), mantendo constante a quantidade total de polímero por unidade de área. Neste caso, utilizou-se um filme de quitosano como controlo porque a  $pH < 6,5$  as pontes dissulfureto não se estabelecem entre as cadeias proteicas, pelo menos em número que possibilite, nestas condições de pH, a obtenção de filmes com propriedades mecânicas satisfatórias. Estes filmes apresentaram duas superfícies distintas: superfície superior (exposta às condições atmosféricas de temperatura e humidade durante a secagem) e a superfície inferior (em contacto com a placa de acrílico), pelo que ambas as superfícies foram caracterizadas. Os filmes de quitosano e WPI apresentam propriedades mecânicas moderadas (pouco flexíveis e baixa resistência mecânica), são barreiras moderadas ao vapor de água e verificou-se ainda que se trata de um sistema pouco estável, no qual ocorre a separação de fases (através da análise por espectroscopia de infravermelho e microscopia electrónica de varrimento (SEM)).

Uma vez que os filmes preparados a pH ácido apresentavam uma estrutura heterogénea e com propriedades mecânicas pouco interessantes, decidiu-se incorporar uma amostra comercial de oligoquitosanos (massa molecular média  $\approx 1700$  Da) na matriz de WPI, pois os oligoquitosanos são solúveis em água e biologicamente mais eficazes. Assim, foram preparados filmes de WPI e oligoquitosanos a pH 7 nas seguintes proporções: 100:1, 75:1 e 50:1, tendo como controlo um filme constituído apenas por WPI. A presença dos oligoquitosanos promoveu a diminuição da rigidez e o aumento da flexibilidade da matriz, o aumento da hidrofiliidade da superfície dos filmes, sem provocar alterações significativas da morfologia da superfície e da permeabilidade ao vapor de água dos mesmos.

Conclui-se assim que a incorporação de oligoquitosanos poderá ser uma estratégia vantajosa para se conseguirem filmes de WPI, com propriedades mecânicas satisfatórias e actividade antimicrobiana útil em aplicações alimentares.

## keywords

Films, biopolymers, chitooligosaccharides, whey protein isolate (WPI), chitosan, barrier properties, mechanical properties, scanning electronic microscopy.

## abstract

The aim of this work was to prepare edible biopolymer films of whey protein isolate at pH 7 and chitosan, as a potential cheese cover, taking advantage from the useful chitosan's biological properties, in particular, antimicrobial activity. The polysaccharide incorporation was made to check if their presence would improve mechanical and barrier properties of films. However, since chitosan is a cationic polysaccharide, the mixture in solution of these two polymers at pH above the isoelectric point of protein ( $pI \approx 5.2$ ) led to precipitation of them. Due to the impossibility of forming WPI films at pH 7 in the presence of chitosan with intermediate molecular weight, new films were prepared with chitosan and WPI at pH 3.5 in the following proportions: 1:0, 6:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2 and 1:3. (chitosan:protein), keeping constant the total amount of polymer per unit of area. In this case, a chitosan film was used as control because disulfide bridges are not established between protein chains at pH below 6.5, or at least would not be formed in enough amount to originate a film with acceptable mechanical properties. The prepared films had two different surfaces: upward surface (was exposed to atmospheric conditions of humidity and temperature during the drying process) and downward surface (in contact with acrylic plate during the drying process), which were characterized independently. After the films characterization it was concluded that these have moderate mechanical properties, and moderate water vapour permeability. It was also noticed that these films are heterogeneous systems in which phase separation occurs (through FTIR and SEM analysis). Since the prepared films at acid pH had a heterogeneous structure and unattractive mechanical properties, it was decided to incorporate a commercial sample of chitooligosaccharides (average molecular weight  $\approx 1700$  Da) in the WPI matrix, taking advantage of their higher water solubility (unlike chitosan with higher molecular weight) and more effective biological activity. Thus WPI and chitooligosaccharides were prepared at pH 7 in the following proportions: 100:1, 75:1 and 50:1, using a WPI film as control. The presence of chitooligosaccharides promoted the reduction of stiffness and the increasing of elongation of the matrix, the increase in film's surface hydrophilicity, but did not change, significantly, the film's surface morphology and their water vapour permeability. Therefore, incorporation of the chitooligosaccharides may be an attractive strategy in order to obtain films and coatings with potential antimicrobial activity, and satisfactory mechanical properties and barrier properties

## *Índice*

---



## **Índice Geral**

<b><i>Índice .....</i></b>	<b><i>1</i></b>
----------------------------	-----------------

<b><i>Objectivos.....</i></b>	<b><i>7</i></b>
-------------------------------	-----------------

<b><i>1. Introdução .....</i></b>	<b><i>11</i></b>
-----------------------------------	------------------

1.1 Filmes e Revestimentos.....	12
1.1.1 Origem e definição.....	12
1.1.2 Formulação.....	13
1.1.3 Propriedades funcionais .....	14
1.1.4 Propriedades de barreira .....	16
1.1.5 Propriedades mecânicas .....	18
1.2 Proteínas do soro do leite (WPI) .....	22
1.2.1 Caracterização.....	22
1.2.2 Aplicações .....	23
1.2.3 Filmes de WPI.....	23
1.2.3.1 Formulação .....	24
1.2.3.2 Propriedades de barreira e mecânicas.....	25
1.2.3.3 Aplicações .....	25
1.3 Quitosano.....	27
1.3.1 Caracterização.....	27
1.3.2 Obtenção .....	29
1.3.3 Aplicações .....	30
1.3.4 Oligoquitosanos .....	35
1.3.4.1 Actividade antimicrobiana.....	36
1.3.4.2 Actividade antitumoral .....	36
1.3.4.3 Actividade antioxidante.....	37
1.4 Filmes constituídos por proteínas e polissacarídeos .....	38

<b><i>2. Materiais e Métodos .....</i></b>	<b><i>41</i></b>
--	------------------

2.1 Materiais.....	42
2.2 Métodos.....	42
2.2.1 Ensaios preliminares – Efeito do pH e da quantidade de quitosano .....	42
2.2.2 Formulação de filmes de WPI a pH ácido .....	42
2.2.3 Formulação dos filmes de quitosano a pH 3,5 .....	43
2.2.4 Formulação de filmes de quitosano e WPI a pH 3,5 .....	43
2.2.5 Formulação de filmes de WPI a pH 7 .....	44
2.2.6 Formulação de filmes de WPI e oligoquitosanos a pH 7.....	44
2.2.7 Caracterização dos filmes preparados.....	45
2.2.7.1 Determinação das propriedades mecânicas .....	45
2.2.7.2 Determinação da permeabilidade ao vapor de água (WVP).....	45
2.2.7.3 Determinação do ângulo de contacto.....	47
2.2.7.4 Análise por FTIR.....	48
2.2.7.5 Análise por microscopia electrónica de varrimento (SEM) .....	48

<b><u>3. Resultados e Discussão .....</u></b>	<b><u>49</u></b>
3.1 Ensaio preliminares – Efeito do pH e da quantidade de quitosano .....	50
3.2 Formulação de filmes de WPI.....	50
3.3 Caracterização dos filmes de quitosano e WPI pH 3,5 .....	51
3.3.1 Determinação das propriedades mecânicas .....	51
3.3.2 Determinação da permeabilidade ao vapor de água (WVP).....	54
3.3.3 Determinação do ângulo de contacto .....	57
3.3.4 Análise por FTIR .....	58
3.3.5 Análise por microscopia electrónica de varrimento (SEM).....	61
<i>Superfície Superior</i> .....	61
<i>Superfície Inferior</i> .....	63
<i>Secção Transversal</i> .....	64
3.4 Caracterização dos filmes de WPI e oligoquitosanos a pH 7.....	67
3.4.1 Determinação das propriedades mecânicas .....	67
3.4.2 Determinação da permeabilidade ao vapor de água (WVP).....	69
3.4.3 Determinação do ângulo de contacto .....	70
3.4.4 Análise por microscopia electrónica de varrimento.....	72
<b><u>4. Conclusões .....</u></b>	<b><u>75</u></b>
<b><u>5. Referências Bibliográficas.....</u></b>	<b><u>79</u></b>

## **Índice de Figuras**

<b>Figura 1</b> – Curva de tensão vs taxa de deformação de um filme comestível à base de proteína .....	19
<b>Figura 2</b> – Diferentes tipos de curvas tensão vs taxa de deformação de polímeros .....	21
<b>Figura 3</b> - Estrutura do quitosano .....	28
<b>Figura 4</b> – Reacção de desacetilação da quitina dando origem ao quitosano.....	29
<b>Figura 5</b> – Curvas de tensão em função da deformação, correspondentes a filmes de quitosano e WPI nas seguintes proporções: 1:0, 1:1 e 1:3 (quitosano:WPI).....	52
<b>Figura 6</b> – Parâmetros mecânicos dos filmes de quitosano e WPI nas diferentes proporções (quitosano:WPI); as barras de erro representam os desvios padrão correspondentes à média de 7 réplicas .....	54
<b>Figura 7</b> – Permeabilidade ao vapor de água da superfície superior e inferior dos filmes de quitosano e WPI nas diferentes proporções (quitosano:WPI); as barras de erro representam os desvios padrão correspondentes à média de 3 réplicas .....	56
<b>Figura 8</b> – Ângulo de contacto, usando a água como solvente, das superfícies superior e inferior dos filmes de quitosano e WPI nas diferentes proporções (quitosano:WPI); as barras de erro representam os desvios padrão correspondentes à média de 10 réplicas .....	58
<b>Figura 9</b> – Diagrama de coordenadas factoriais de PC1 em função da composição dos filmes de quitosano e WPI.....	59
<b>Figura 10</b> – Diagrama de contribuições factoriais de PC1 para os filmes de quitosano e WPI preparados .....	60
<b>Figura 11</b> – Imagem da superfície superior do filme de quitosano e WPI (1:0) obtida através do SEM a 1,0 kV, com uma ampliação 1000x.....	61
<b>Figura 12</b> – Imagem da superfície superior do filme de quitosano e WPI (1:1) obtida através do SEM a 1,0 kV, com uma ampliação 1000x.....	62
<b>Figura 13</b> – Imagem da superfície superior do filme de quitosano e WPI (1:3) obtida através do SEM a 1,0 kV, com uma ampliação 1000x.....	62
<b>Figura 14</b> – Imagens da superfície inferior do filme de quitosano e WPI (1:0) obtidas através do SEM a 1,0 kV, com ampliações 300x (esquerda) e 1000x (direita).....	63
<b>Figura 15</b> – Imagens da superfície inferior do filme de quitosano e WPI (1:1) obtidas através do SEM a 1,0 kV, com ampliações 300x (esquerda) e 1000x (direita).....	63
<b>Figura 16</b> – Imagens da superfície inferior do filme de quitosano e WPI (1:3) obtidas através do SEM a 1,0 kV, com ampliações 300x (esquerda) e 1000x (direita).....	63

<b>Figura 17</b> – Imagem da secção transversal do filme de quitosano e WPI (1:0) obtida através do SEM a 1,0 kV, com uma ampliação de 1000x .....	64
<b>Figura 18</b> – Imagem da secção transversal do filme de quitosano e WPI (3:1) obtida através do SEM a 1,0 kV, com uma ampliação de 1000x .....	64
<b>Figura 19</b> – Imagem da secção transversal do filme de quitosano e WPI (1:1) obtida através do SEM a 1,0 kV, com uma ampliação de 1000x .....	64
<b>Figura 20</b> – Imagem da secção transversal do filme de quitosano e WPI (1:2) obtida através do SEM a 1,0 kV, com uma ampliação de 1000x .....	65
<b>Figura 21</b> – Imagem da secção transversal do filme de quitosano e WPI (1:3) obtida através do SEM a 1,0 kV, com uma ampliação de 1000x .....	65
<b>Figura 22</b> – Curvas de tensão <i>versus</i> taxa de deformação dos filmes de WPI e oligoquitosanos a pH 7, tendo o filme de WPI como controlo .....	67
<b>Figura 23</b> – Imagens da superfície do filme de WPI obtidas através do SEM a 1,0 kV, com ampliações 300x (esquerda) e 1000x (direita).....	72
<b>Figura 24</b> – Imagens da superfície do filme de WPI e oligoquitosanos na proporção (50:1), obtidas através do SEM a 1,0 kV, com ampliações 300x (esquerda) e 1000x (direita).....	72
<b>Figura 25</b> – Imagens da superfície do filme de WPI e oligoquitosanos na proporção (100:1), obtidas através do SEM a 1,0 kV, com ampliações 300x (esquerda) e 1000x (direita) .....	73

## **Índice de Tabelas**

<b>Tabela 1</b> – Componentes dos filmes à base de biopolímeros naturais .....	14
<b>Tabela 2</b> – Permeabilidade ao vapor de água para diferentes tipos de filmes .....	18
<b>Tabela 3</b> - Parâmetros mecânicos de diferentes tipos de filmes .....	20
<b>Tabela 4</b> – Características físico-químicas das principais proteínas do soro do leite.....	22
<b>Tabela 5</b> – Principais objectivos associados à aplicação de filmes/revestimentos comestíveis à base de proteínas do soro do leite .....	26
<b>Tabela 6</b> – Aplicações dos filmes de WPI nos alimentos .....	26
<b>Tabela 7</b> – Aplicação do quitosano em diversas áreas .....	31
<b>Tabela 8</b> – Aplicações da quitina, quitosano e derivados na indústria alimentar .....	34
<b>Tabela 9</b> – Resultados obtidos partindo de soluções de WPI com pH 4-2,3 .....	51
<b>Tabela 10</b> – Parâmetros mecânicos e espessura dos filmes de quitosano e WPI nas diferentes proporções.....	52
<b>Tabela 11</b> – Permeabilidade ao vapor de água da superfície superior e inferior dos filmes de quitosano e WPI nas diferentes proporções .....	55
<b>Tabela 12</b> – Ângulos de contacto (usando como solvente a água) da superfície superior e inferior dos filmes de quitosano e WPI nas diferentes proporções .....	57
<b>Tabela 13</b> – Parâmetros mecânicos e espessura dos filmes de WPI e oligoquitosanos nas diferentes proporções, tendo o filme de WPI como controlo .....	68
<b>Tabela 14</b> – Permeabilidade ao vapor de água dos filmes de WPI e oligoquitosanos nas diferentes proporções, tendo o filme de WPI como controlo .....	69
<b>Tabela 15</b> – Ângulo de contacto dos filmes de WPI e oligoquitosanos nas diferentes proporções, tendo o filme de WPI como controlo.....	70

## ***Objetivos***

---

O objectivo principal deste trabalho foi a formulação de filmes comestíveis à base de um isolado de proteínas do soro do leite (WPI), que possuíssem na sua composição um polissacarídeo derivado da quitina, que se designa por quitosano, de forma a conferir novas funcionalidades à membrana proteica, por exemplo, propriedades antimicrobianas, melhorando, se possível, as propriedades mecânicas e de barreira.

Uma vez que o quitosano é um polissacarídeo catiónico e sabendo que para  $\text{pH} < \text{pI}$  as proteínas do soro do leite estão positivamente carregadas, as forças repulsivas vão predominar entre estas e o quitosano. Isto quer dizer que nas condições referidas, não será de esperar que ocorra a precipitação dos dois polímeros em solução (verificando-se o inverso para  $\text{pH} > \text{pI}$ ). Devido a este facto, experimentou-se fazer filmes de WPI a pH ácido, tendo-se constatado que os filmes obtidos não eram suficientemente consistentes para serem destacados das placas de suporte (devido ao facto de não se estabelecerem pontes dissulfureto entre as proteínas do soro do leite, a valores de  $\text{pH} < 6,5$ , pelo menos em número suficiente para garantir a integridade mecânica dos filmes); o mesmo se verificou para filmes à base de WPI a pH ácido, aos quais se adicionou uma pequena quantidade de quitosano de massa molecular média (para se obter um filme de quitosano e WPI com propriedades mecânicas e de barreira razoáveis, é necessário incorporar na matriz de WPI uma quantidade de quitosano 3 vezes inferior à quantidade de WPI).

Uma vez que não se conseguiu incorporar quantidades significativas de quitosano de massa molecular média na matriz de WPI, optou-se por trabalhar com uma matriz base de quitosano, na qual se incorporou WPI em diferentes concentrações, a pH ácido (pH 3,5 porque para valores de pH entre 4 e 6 as proteínas do soro do leite são insolúveis, devido à proximidade do pI).

Prepararam-se vários filmes de quitosano e WPI em diferentes proporções, tendo-se substituído quantidades crescentes de quitosano por WPI, mantendo constante a quantidade total de polímero por unidade de área. Dado que a pH ácido não se consegue obter um filme constituído apenas por WPI, utilizou-se como controlo um filme de quitosano.

Após a preparação e obtenção dos filmes constituídos por quitosano e WPI chegou-se à conclusão que as superfícies dos mesmos apresentavam diferenças, pelo que ao longo de todo o trabalho se faz a distinção entre as duas superfícies: superior (exposta às condições atmosféricas de temperatura e humidade durante a secagem) e inferior (em contacto com a placa de acrílico durante o processo de secagem). Deste modo, procedeu-se à caracterização de ambas as superfícies através das seguintes análises: ensaios mecânicos, determinação da permeabilidade ao vapor de água, medição do ângulo de contacto (água), estudo espectroscópico por infra-vermelho (FTIR) e análise por microscopia electrónica de varrimento (SEM).

Dado que o principal objectivo deste projecto consistia na preparação de filmes à base de WPI a pH 7 na presença de quitosano, procedeu-se à incorporação de oligoquitosanos comerciais (uma vez que estes são solúveis em água) nas seguintes proporções: 100:1, 75:1, 50:1; como controlo usou-se um filme de WPI a pH 7. Esta incorporação foi levada a cabo no sentido de verificar se a presença de oligoquitosanos iria promover a melhoria das propriedades mecânicas e de barreira dos filmes, uma vez que os filmes preparados anteriormente com quitosano e WPI a pH ácido possuíam propriedades mecânicas pouco interessantes. De igual modo, os filmes foram caracterizados relativamente às suas propriedades mecânicas, permeabilidade ao vapor de água, ângulo de contacto e análise morfológica por microscopia electrónica de varrimento.





## ***1. Introdução***

---

## ***1.1 Filmes e Revestimentos***

### ***1.1.1 Origem e definição***

Ao longo dos anos assistiu-se a uma mudança dos hábitos alimentares, pelo que foi surgindo a necessidade de proteger os alimentos (principalmente os alimentos processados), levando assim à criação de embalagens próprias para este fim. A primeira embalagem produzida era composta por folhas, pele de animais ou casca de nozes. Diferentes tipos de materiais começaram a ser usados 5000 aC, entre os quais, plantas, material animal e algumas peças de cerâmica, no sentido de produzir sacos, cestas e pequenos pacotes (Miller e Krochta, 1997).

No século XVI, na Inglaterra, começou-se a recorrer a ceras e banha de porco para revestir frutas e outros produtos alimentares. O primeiro plástico, polímero à base de celulose, foi introduzido em 1856; posteriormente, em 1907, foi descoberto um novo plástico que resultou da junção entre o fenol e o formaldeído (Baquelite) (Kester e Fennema, 1986). A partir desta altura, seguiram várias descobertas e invenções, as quais deram origem a uma enorme variedade de embalagens produzidas através de polímeros sintéticos. Estes polímeros sintéticos constituem excelentes barreiras para os compostos aromáticos, gases e vapor de água (Miller e Krochta, 1997). No entanto, não são biodegradáveis, pelo que conduzem à intensificação da poluição do ambiente e, por consequência, originam problemas a nível ecológico (Tharanathan, 2003). Logo, este tipo de embalagens tem sido alvo de atenção por parte da sociedade, uma vez que constitui cerca de 30% dos resíduos sólidos municipais (Krochta e Mulder-Johnson, 1997). Assim, actualmente a indústria alimentar pretende dar maior ênfase às embalagens constituídas essencialmente por biopolímeros, entre os quais, filmes de biopolímeros biodegradáveis e comestíveis (Miller e Krochta, 1997).

Filmes comestíveis e biodegradáveis, produzidos a partir de biopolímeros, são utilizados como embalagens alternativas sem provocar danos ambientais. Geralmente um filme comestível é definido como uma camada fina e comestível formada sobre a superfície de um alimento como revestimento ou colocada entre componentes do mesmo. Para um filme ser considerado biodegradável, tem de ser completamente degradado pelos microrganismos durante o processo de compostagem, originando apenas compostos

naturais, tais como, dióxido de carbono, água, sais, entre outros. O interesse por este tipo de filmes tem aumentado bastante nos últimos anos. No entanto, a substituição total de filmes sintéticos por filmes biodegradáveis é, ainda, impossível (Krochta e Mulder-Johnson, 1997).

### *1.1.2 Formulação*

Os componentes dos filmes comestíveis estão divididos em três categorias: hidrocolóides, lípidos e compósitos. Os hidrocolóides incluem proteínas (da soja, do soro do leite, do milho, do amendoim, glúten do trigo e colagénio, entre outras) e polissacarídeos (amido, alginatos, celulose e derivados, quitosano e agar, entre outros). Os lípidos englobam ceras, acilgliceróis e ácidos gordos. Os compósitos contêm tanto hidrocolóides como lípidos (Cha e Chinnam, 2004). Na tabela 1 estão referidos diferentes constituintes dos filmes de biopolímeros.

Na maioria dos casos, os filmes biodegradáveis e comestíveis são preparados através do chamado “solvent casting”, em que a solução do(s) biopolímero(s) é colocada num suporte e, posteriormente, promove-se a evaporação do solvente por exposição a uma determinada temperatura, removendo-se o filme formado por destacamento (Tharanathan, 2003).

A formação dos filmes ocorre devido ao estabelecimento de interações inter- e intramoleculares ou entrecruzamento entre as cadeias poliméricas, dando origem a uma rede tridimensional semi-rígida provocando a mobilização do solvente. O grau de coesão depende da estrutura do polímero, do solvente, da temperatura usada na evaporação do solvente e da presença de outras moléculas, tais como, plastificantes (Tharanathan, 2003).

O uso de plastificantes, tais como, o glicerol, sorbitol e polietileno glicol, na formulação de filmes ou compósitos é vantajoso, uma vez que aumenta a flexibilidade dos mesmos. Por consequência, conseguem-se obter filmes mais fáceis de manusear e com taxas de alongamento mais atractivas. A presença do plastificante provoca a redução da rigidez do filme, porque este tipo de compostos de baixa massa molecular dificulta o estabelecimento de ligações por pontes de hidrogénio entre as cadeias poliméricas (aumentando a mobilidade das mesmas). É de salientar que a presença do plastificante nos filmes não influencia apenas as propriedades mecânicas dos mesmos, mas também as

propriedades de barreira, através da diminuição da permeabilidade ao vapor de água e a outros gases (devido à sua natureza hidrofóbica) (Kester e Fennema, 1986).

Para se proceder à formulação dos filmes, é necessário usar pelo menos um componente que seja capaz de formar uma matriz estrutural suficientemente coesa. Apenas polímeros com elevada massa molecular, devido à sua capacidade de coesão, podem dar origem a filmes com uma estrutura deste tipo. O grau de coesão da matriz polimérica afecta as propriedades dos filmes, tais como, densidade e compactibilidade, porosidade e permeabilidade, flexibilidade e rigidez. A maior parte dos biopolímeros naturais podem ser usados para a preparação de filmes (Rhim e NG, 2007).

**Tabela 1** – Exemplos de componentes dos filmes à base de biopolímeros naturais

---

<b>1. Materiais para a formulação dos filmes</b>	
-	<b>Polissacarídeos:</b> amido, celulose e derivados, pectina, alginato, carragenana, quitosano e gomas naturais
-	<b>Proteínas:</b> caseínas, proteínas do soro do leite, gelatina, queratina, proteína de soja e glúten do trigo
-	<b>Lípidos:</b> lípidos neutros, ácidos gordos e ceras
<b>2. Aditivos</b>	
-	<b>Plastificantes:</b> glicerol, polietileno glicol, propileno glicol, sorbitol e água
-	<b>Ingredientes funcionais:</b> antimicrobianos, antioxidantes, aromas, corantes, vitaminas e outros nutracêuticos

---

### *1.1.3 Propriedades funcionais*

Os filmes biodegradáveis e comestíveis protegem os alimentos do ambiente. A qualidade e o tempo de prateleira são reduzidos quando os alimentos, através da interacção com factores ambientais, sofrem um aumento ou diminuição da humidade/compostos aromáticos e, ainda, quando se encontram expostos ao oxigénio (originando a oxidação lipídica) ou quando são contaminados por microrganismos (Tharanathan, 2003).

Em alimentos constituídos por vários componentes, a qualidade e o tempo de prateleira são também reduzidos quando a humidade, aromas ou lípidos migram de um componente do alimento para outro (Krochta e Mulder-Johnson, 1997). De seguida,

encontram-se referidas algumas propriedades funcionais dos filmes em questão (Tharanathan, 2003; Debeaufort *et al.*, 1998):

- ✓ promovem a redução da taxa de absorção de oxigénio do alimento (respiração lenta mas controlada);
- ✓ constituem uma barreira selectiva para os gases (p.ex., oxigénio, dióxido de carbono e vapor de água);
- ✓ criam uma atmosfera modificada relativamente à composição interna de gases podendo, p.ex. regular o processo de amadurecimento e, consequentemente, aumentar o tempo de vida de determinado alimento;
- ✓ atenuam a migração de lípidos (usados na indústria alimentar);
- ✓ permitem a manutenção da integridade estrutural e protecção contra os choques mecânicos;
- ✓ servem como veículo de incorporação de aditivos alimentares (aromas, corantes, antioxidantes, agentes antimicrobianos);
- ✓ previnem ou reduzem o desenvolvimento de microrganismos durante o armazenamento.

A principal causa da deterioração do alimento é o desenvolvimento de microrganismos à sua superfície. A aplicação de agentes antimicrobianos nos filmes e revestimentos cria um ambiente no interior dos mesmos que permite evitar ou prevenir o crescimento de microrganismos à superfície do alimento e, consequentemente, provocar o aumento do tempo de prateleira e/ou tornar o alimento mais seguro (Cha e Chinnam, 2004).

Os agentes antimicrobianos químicos são as substâncias usadas com mais frequência na indústria alimentar, entre as quais, ácidos orgânicos, fungicidas, alcoóis e antibióticos. Estes agentes têm propriedades antisépticas em determinadas condições de utilização e são conhecidos como conservantes alimentares. Os conservantes alimentares geralmente são substâncias estáveis, sendo pouco provável que estas se decomponham dentro de um determinado período de tempo (Cha e Chinnam, 2004).

Também é de salientar que existem alguns polímeros naturais que exibem actividade antimicrobiana, destacando-se os derivados da quitina. O quitosano de massa

molecular baixa ou média apresenta uma actividade antimicrobiana significativa, enquanto que o quitosano de elevado peso molecular não é tão eficaz (Ahvenainen, 2003). Este agente antimicrobiano natural tem sido incorporado em filmes e revestimentos. (Cha e Chinnam, 2004).

O quitosano foi recentemente aprovado como ingrediente alimentar pela Food and Drug Administration, pelo que a sua utilização como agente antimicrobiano, bem como no desenvolvimento de novos produtos, tem sido cada vez mais frequente (Ahvenainen, 2003).

#### *1.1.4 Propriedades de barreira*

Tal como já foi referido anteriormente, uma das principais funções dos filmes é proteger os alimentos dos possíveis efeitos causados pelo meio ambiente, tais como, água, vapor de água, gases, aromas, microrganismos e choques mecânicos.

O desenvolvimento de filmes comestíveis para o envolvimento de alimentos exige o conhecimento das propriedades de barreira dos mesmos. Deste modo, é necessário considerar a permeabilidade dos filmes ao vapor de água, aromas, solutos e lípidos. É ainda de salientar que a adição de agentes plastificantes aos polímeros provoca alterações nas propriedades mecânicas e de barreira dos filmes (Robertson, 2006).

Neste trabalho experimental apenas se procedeu ao estudo da permeabilidade dos filmes ao vapor de água.

A permeabilidade de uma membrana é calculada a partir da combinação entre a 1ª lei de Fick da difusão e da lei de Henry da solubilidade. Determina-se assim o fluxo do permeato através de uma membrana não porosa, assumindo que não apresenta imperfeições (Robertson, 1993).

A taxa de transmissão do vapor de água (WVTR) define-se como o fluxo estacionário de vapor de água, por unidade de tempo, através da área unitária do material, na direcção normal à superfície do material, sob condições definidas de temperatura e humidade relativa. A permeância ao vapor de água consiste na taxa de transmissão de vapor de água através da área unitária do material, induzida por uma diferença unitária de pressão de vapor entre duas superfícies específicas do material, sob condições definidas de temperatura e humidade relativa (Robertson, 1993).

A permeância é assim uma medida de fluxo que não considera a espessura do filme e é usada para a avaliação do desempenho desse filme, em vez de descrever uma propriedade intrínseca do material. A permeabilidade ao vapor de água (WVP) é definida como a permeância através de uma membrana de espessura unitária. Portanto, trata-se do produto entre a permeância e a espessura da membrana (Robertson, 1993).

A natureza hidrofílica dos polímeros constituintes dos filmes comestíveis limita a sua acção protectora como barreira para o vapor de água. Deste modo, para que filmes e revestimentos comestíveis sejam usados com este fim, é necessário adicionar materiais com carácter hidrofóbico, como por exemplo, ceras e ácidos gordos comestíveis (Krochta e Mulder-Johnson, 1997). No entanto, pelo facto de estes filmes apresentarem um certo carácter hidrofílico (havendo assim o estabelecimento de interacções por pontes de hidrogénio entre os polímeros), constituem excelentes barreiras para substâncias apolares, tais como, oxigénio, lípidos e alguns compostos aromáticos a um valor de humidade relativa controlada. É ainda de salientar que, com o aumento das interacções entre os polímeros, dá-se a diminuição da permeabilidade dos filmes em questão (Miller e Krochta, 1997).

De acordo com Krochta e Mulder-Johnson (1997), os filmes são considerados como fracas barreiras para o vapor de água para valores de WVP entre 0,4 e 4,2 g.mm/m<sup>2</sup>.h.kPa, barreiras moderadas para valores de WVP entre 0,004 e 0,4 g.mm/m<sup>2</sup>.h.kPa e boas barreiras quando apresentam um valor de WVP entre  $4 \times 10^{-4}$  e  $4 \times 10^{-3}$  g.mm/m<sup>2</sup>.h.kPa. Com base nestes valores pode-se efectuar uma classificação dos filmes de biopolímeros segundo a sua permeabilidade ao vapor de água. A tabela 2 representada abaixo faz referência aos valores de WVP correspondentes a diferentes tipos de filmes.



**Tabela 2** – Permeabilidade ao vapor de água para diferentes tipos de filmes

Tipo de filme	WVP (g.mm/ m <sup>2</sup> .h.kPa)	Referência
WPI:Glicerol = 2:1	12,12	Banerjee e Chen, 1995
WPI:Glicerol = 1:1	6,40	McHugh <i>et al.</i> , 1994
Quitosano	0,07-0,17	Butler <i>et al.</i> , 1996
Polietileno de baixa densidade (LDPE)	0,0013	Shellhammer e Krochta, 1997

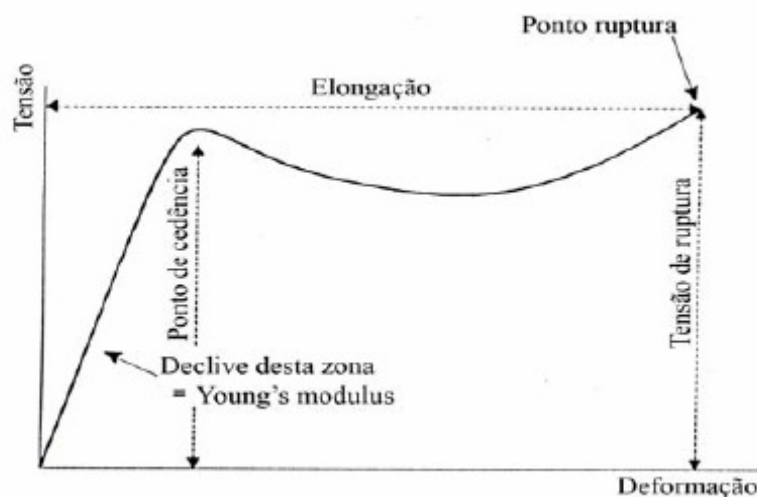
Considerando a escala referida anteriormente, pode-se afirmar que os filmes biodegradáveis são barreiras fracas para o vapor de água, comparativamente aos polímeros sintéticos. É ainda de notar que quanto maior for a quantidade de plastificante adicionada ao polímero, menor será a permeabilidade ao vapor de água, conferindo melhor protecção relativamente ao vapor de água. Por outro lado, a presença do plastificante provoca a diminuição da capacidade dos filmes para actuarem como barreiras eficazes para o oxigénio, aromas e lípidos (Gennadios, 2002).

#### *1.1.5 Propriedades mecânicas*

As propriedades mecânicas dos filmes e revestimentos comestíveis são tão importantes como as propriedades de barreira. Estes são utilizados com diversos fins, nomeadamente, para proteger os alimentos durante o seu manuseamento e transporte. Em muitos casos, os filmes e revestimentos comestíveis são utilizados para alterar (no sentido de melhorar) as propriedades mecânicas de diversos materiais, como por exemplo, no encapsulamento de líquidos e sólidos. Deste modo, a informação quantitativa obtida a partir dos parâmetros mecânicos é essencial para se proceder à caracterização destes materiais (Chen, 1995).

O teste usado com mais frequência para se estudar as propriedades mecânicas dos filmes é o teste de aplicação de tensão uniaxial. Neste tipo de ensaio, os filmes são submetidos a uma deformação crescente, sendo os parâmetros obtidos registados ao longo

do ensaio. Assim, obtêm-se curvas de tensão *versus* deformação, a partir das quais se podem determinar os seguintes parâmetros mecânicos: tensão no ponto de ruptura, tensão de cedência, módulo de Young e alongamento no ponto de ruptura. Na figura 1 está exemplificada uma curva de tensão *versus* deformação de um filme à base de proteína. É ainda de notar que nestes ensaios os resultados obtidos são bastante influenciados pelas condições experimentais, tais como: acondicionamento, tamanho da amostra, temperatura, humidade relativa, magnitude da deformação aplicada e velocidade de aplicação (Chen, 1995).



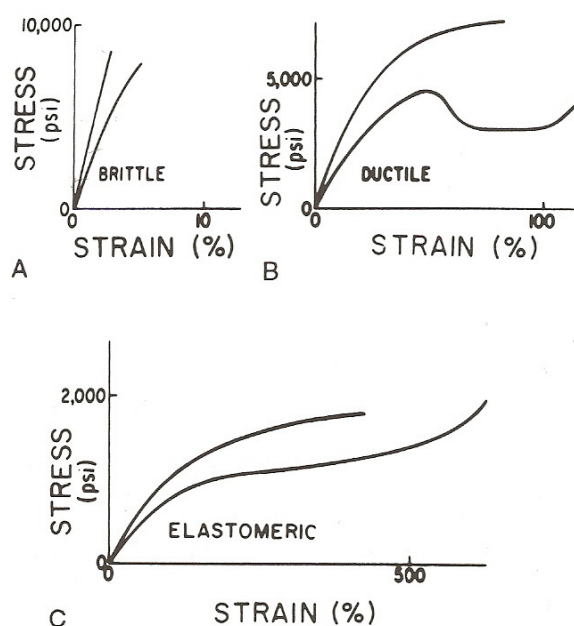
**Figura 1** – Curva de tensão *vs* deformação de um filme comestível à base de proteína

A tensão no ponto de ruptura é a tensão máxima que o filme consegue sustentar. O alongamento é, normalmente, determinado no ponto da ruptura do filme e é expresso em percentagem, relativamente à altura inicial da amostra. A tensão de cedência é o valor de tensão aplicada para o qual se observa o primeiro sinal de deformação não elástica. Finalmente, o módulo de Young (também denominado módulo de elasticidade ou de rigidez) corresponde à razão entre a tensão aplicada e o alongamento sofrido pelos filmes, ao longo da zona linear da curva tensão vs deformação. A partir deste, consegue-se medir a rigidez intrínseca dos filmes. Entre todos estes parâmetros mecânicos, os mais estudados são a tensão no ponto de ruptura e o alongamento dos filmes, de forma a simplificar o processamento dos dados (Chen, 1995). A tabela 3 representada abaixo apresenta alguns exemplos obtidos para diferentes tipos de filmes.

**Tabela 3** – Parâmetros mecânicos de diferentes tipos de filmes

<b>Tipo de filme</b>	<b>Tensão no ponto de ruptura (MPa)</b>	<b>Deformação no ponto de ruptura (%)</b>	<b>Referência</b>
WPI:Glicerol = 2:1	5,76	22,7	Chen, 1995
Quitosano (não neutro)	41,6	42,4	Rhim <i>et al.</i> , 1998
Polietileno de baixa densidade (LDPE)	13,0	500	Chen, 1995

Diferentes materiais apresentam diferentes propriedades mecânicas. Estas diferenças devem-se à natureza e densidade das interações intermoleculares estabelecidas entre os polímeros constituintes dos filmes, bem como da espessura dos mesmos (Chen, 1995). Por exemplo, os filmes biodegradáveis à base de proteínas do soro do leite apresentam pouca tendência para alongar, comparativamente com os filmes de quitosano e LDPE. Por sua vez, os filmes de quitosano apresentam maior resistência no ponto de ruptura. Na figura 2 encontram-se representados diferentes comportamentos a nível das curvas tensão vs deformação para diversos polímeros, determinadas a uma velocidade constante de alongamento (Nielsen e Landel, 1994).



**Figura 2** – Diferentes tipos de curvas tensão vs deformação de polímeros

O gráfico A representa o comportamento de materiais quebradiços; o gráfico B é típico de polímeros rígidos; por fim, o gráfico C é característico de materiais elásticos (Nielsen e Landel, 1994).

Segundo Krochta and Mulder-Johnson (1997) os filmes têm propriedades mecânicas moderadas quando apresentam uma tensão no ponto da ruptura entre 10 e 100 MPa e uma deformação no ponto da ruptura entre 10 e 50 %. Deste modo, pode-se afirmar que, entre os filmes referidos na tabela 2, os de quitosano são os que apresentam propriedades mecânicas mais interessantes.

## 1.2 Proteínas do soro do leite (WPI)

### 1.2.1 Caracterização

A fracção proteica do soro do leite é muito heterogénea, constituída essencialmente, por  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactalbumina, albumina sérica, imunoglobulinas, derivados de  $\beta$ -caseína (proteose peptonas) e ainda, em menor quantidade, lactoperoxidase, lactotransferrina e outras enzimas. A  $\beta$ -lactoglobulina na forma monomérica contém duas ligações dissulfureto intramoleculares e um grupo tiol livre (-SH). A  $\alpha$ -lactalbumina monomérica é uma metaloproteína (liga ao cálcio), a qual possui quatro ligações dissulfureto intramoleculares (Tabela 4). As proteínas que constituem o soro do leite, contrariamente às caseínas, são menos resistentes termicamente, sofrendo a desnaturação a uma temperatura próxima de 70°C (Pérez-Gago e Krochta, 2002).

**Tabela 4** – Características físico-químicas das principais proteínas do soro do leite

Proteína	Número de resíduos de aminoácidos	pI	Massa molecular (kDa)	Número de resíduos de prolina	Número de resíduos de cisteína
$\beta$ -lactoglobulina	162	5,2	18	8	5
$\alpha$ -lactalbumina	123	4,2-4,5	14	2	8
BSA	582	5,3	66	28	35
Ig	Variável		150-900		
Proteose peptonas	Variável		4,1-40,8		

As proteínas globulares do soro do leite, na conformação nativa, são solúveis a baixa força iónica, numa vasta gama de pH. A solubilidade destas proteínas diminui com o aumento da concentração de sais e podem-se tornar insolúveis após a desnaturação térmica a temperaturas superiores a 70°C. O grau de desnaturação e a subsequente insolubilidade depende do binómio tempo/temperatura de aquecimento, do pH e da concentração de cálcio durante o aquecimento (Pérez-Gago e Krochta, 2002).

### *1.2.2 Aplicações*

As proteínas do soro do leite são um subproduto da indústria do queijo e, geralmente, têm sido usadas para produzir ração animal, suplementos alimentares, alimentos energéticos para desportistas, entre outros. Actualmente, tem-se feito um grande investimento no reaproveitamento do soro do leite, como por exemplo, utilizando o soro do leite para a produção de filmes comestíveis e biodegradáveis. O interesse em estudar este tipo de filmes tem aumentado na última década, devido ao facto de estes serem “amigos do ambiente”, contrariamente aos filmes sintéticos que são frequentemente usados como embalagens (Anker *et al.*, 1998).

### *1.2.3 Filmes de WPI*

Diversos materiais têm sido usados para a produção de filmes comestíveis, tais como, proteínas, polissacarídeos e lípidos. Entre estes, destaca-se a utilização de proteínas do soro do leite. Com a adição do plastificante e desnaturação da solução de proteínas do soro, conseguem-se obter filmes transparentes, brandos e flexíveis com excelentes propriedades de barreira (para o oxigénio, aromas e lípidos), a baixos valores de humidade relativa (Miller e Krochta, 1997). Quando a formulação dos filmes inclui a desnaturação da solução de proteína, estes filmes tornam-se insolúveis em água e têm melhores propriedades mecânicas, facto que pode contribuir para a melhoria da manutenção da integridade dos alimentos. No entanto, a natureza hidrofílica dos filmes de WPI é responsável pela baixa eficácia como barreira para o vapor de água. Esta propriedade pode ser melhorada com a incorporação de lípidos (Pérez-Gago e Krochta, 2002).

### 1.2.3.1 Formulação

As interações proteína-proteína determinam as características de um filme constituído por proteínas. A capacidade de formação de um filme pode ser influenciada pela composição em aminoácidos, distribuição e polaridade; condições que afectam a formação de interligações entre os grupos amina e carboxílico; presença de grupos que estabelecem ligações de hidrogénio e pontes dissulfureto intramoleculares e intermoleculares (Pérez-Gago e Krochta, 2002).

As proteínas do soro na sua forma nativa são globulares, contendo a maior parte dos grupos hidrofóbicos e SH no interior da molécula. A formação de filmes de proteínas do soro do leite envolve a desnaturação térmica das proteínas do soro, em solução aquosa. O aquecimento provoca alterações da estrutura tridimensional da proteína, causando por consequência a exposição dos grupos hidrofóbicos e SH que estavam no interior da molécula, facto que promove o estabelecimento de ligações S-S e interações hidrofóbicas durante a secagem, o que contribui para a formação do filme com propriedades mecânicas aceitáveis.

As alterações estruturais que ocorrem nas proteínas durante a desnaturação e as ligações S-S que se estabelecem durante a evaporação do solvente, são responsáveis pela insolubilidade em água, dando origem a filmes mais fortes e mais resistentes à deformação. A baixa energia das ligações e a estrutura globular das proteínas nativas contribuem para a solubilidade completa em água e para as fracas propriedades mecânicas dos filmes formados a partir destas proteínas, comparativamente às proteínas que foram submetidas a desnaturação térmica (Pérez-Gago e Krochta, 2002).

O ponto isoeléctrico médio das proteínas do soro do leite é, aproximadamente, 5,2. Para valores de pH entre 4 e 6, as forças repulsivas no sistema são reduzidas (devido à proximidade do ponto isoeléctrico), pelo que as moléculas proteicas tendem a formar agregados, originando assim filmes brancos e opacos; a  $\text{pH} < 4$  estes são transparentes e frágeis, enquanto que a  $\text{pH} > 6$  os filmes são transparentes e flexíveis (Anker *et al.*, 1998).

### 1.2.3.2 Propriedades de barreira e mecânicas

A propriedade de transporte mais estudada para este tipo de filmes é a permeabilidade ao vapor de água. De um modo geral, a natureza hidrofílica das proteínas impede que os filmes à base de WPI constituam barreiras eficientes para o vapor de água, comparativamente aos filmes constituídos por polímeros sintéticos, tais como polietileno de baixa densidade (LPDE), cloreto de polivinilideno (PVDC) e cloreto de polivinilo (PVC) (Gennadios, 2002). Pode-se mesmo afirmar que os valores de WVP para os filmes de WPI são duas a quatro ordens de magnitude superiores aos filmes de LDPE. Por outro lado, os filmes de WPI são menos permeáveis a substâncias apolares, tais como, oxigénio, compostos aromáticos e óleos (Gennadios, 2002a). É de notar que o aumento da hidrofobicidade dos filmes provoca a diminuição do WVP. Tal pode ser conseguido através incorporação de agentes plastificantes com carácter hidrofóbico (Gennadios, 2002).

As propriedades mecânicas determinadas com mais frequência, para se proceder à caracterização dos filmes, são a tensão/alongamento no ponto de ruptura e o módulo de Young. A tenacidade dos filmes é determinada a partir do produto entre a tensão e o alongamento no ponto de ruptura. Os filmes de WPI apresentam valores de tensão no ponto de ruptura mais baixos do que grande parte dos filmes de polissacarídeos e do que os filmes de polímeros sintéticos; relativamente aos valores do alongamento no ponto de ruptura, são inferiores aos dos filmes sintéticos. A quantidade de plastificante adicionada aos filmes é determinante para as propriedades mecânicas dos mesmos. O aumento da quantidade de plastificante provoca a diminuição da tensão no ponto de ruptura e do módulo de Young, bem como o aumento do alongamento no ponto da ruptura (Gennadios, 2002a).

### 1.2.3.3 Aplicações

A utilização de filmes/revestimentos biodegradáveis, bem como de outros produtos biodegradáveis, tem como objectivo substituir produtos sintéticos já existentes, a baixo custo. Para além disso, pretende-se ainda aumentar a qualidade e o tempo de prateleira dos produtos alimentares, tentando evitar possíveis efeitos resultantes da migração de humidade e oxigénio, protecção contra microrganismos, manutenção da integridade e



optimização da aparência do produto. No entanto, tudo isto deve ser relacionado com os custos associados aos materiais utilizados para a preparação dos filmes/revestimentos e aos processos de produção. Na tabela 5 encontram-se referidos, de forma sucinta, os motivos pelos quais os filmes/revestimentos comestíveis são utilizados (Gennadios, 2002).

**Tabela 5** – Principais objectivos associados à aplicação de filmes/revestimentos comestíveis à base de proteínas do soro do leite

<b>Objectivos gerais</b>
Redução da migração de oxigénio, aromas e/ou humidade
Manutenção da integridade do produto alimentar
Melhoramento da aparência do produto alimentar
Minimização dos custos dos materiais e processos usados na preparação dos filmes/revestimentos
Redução da produção de embalagens sintéticas

Existem possíveis aplicações para filmes e revestimentos que ainda não foram postas em prática por diversas razões: os materiais necessários para a formação dos filmes e revestimentos são, em muitos casos, caros; por vezes a formulação é bastante difícil; noutros casos, os materiais comerciais utilizados para a formulação não apresentam as propriedades necessárias para que tal aconteça (Gennadios, 2002).

Na tabela 6 referem-se alguns exemplos de aplicações dos filmes de WPI (Khwaldia *et al.*, 2004).

**Tabela 6** – Aplicações dos filmes de WPI nos alimentos

<b>Alimento</b>	<b>Função</b>
Banana	Redução a taxa de amadurecimento
Frango liofilizado	Redução das alterações mecânicas
Cereais de pequeno-almoço	Barreira para o vapor de água
Amendoins	Redução da oxidação lipídica
Nozes	Redução da oxidação lipídica

### 1.3 Quitosano

#### 1.3.1 Caracterização

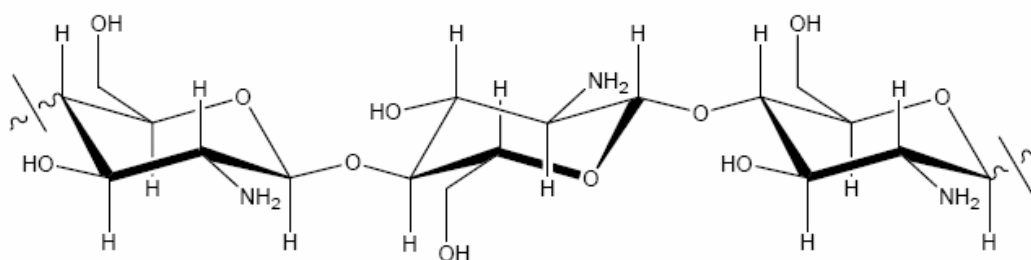
Uma vez que os polissacarídeos naturais apresentam estruturas e propriedades bastante diferentes dos polímeros sintéticos, são considerados biopolímeros de interesse para o desenvolvimento de novos produtos. Entre os vários polissacarídeos que surgem na natureza, a celulose e a quitina são os que existem em maiores quantidades, sendo produzidas cerca de  $10^{11}$  toneladas por ano. Os polissacarídeos em questão são os compostos orgânicos mais abundantes na Terra. A celulose e a quitina são encontrados principalmente nas plantas e animais, respectivamente, como materiais de protecção do organismo. Existe uma grande semelhança estrutural entre estes polissacarídeos; a única diferença é que a quitina possui um grupo acetilamida em C-2, em vez do grupo hidroxilo na celulose (Kurita, 2006).

A quitina é o segundo biopolímero mais abundante na Terra depois da celulose, sendo constituída por 2-aceto-amido-2-desoxi- $\beta$ -D-glucose (N-acetilglucosamina) em ligação  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4). Este biopolímero é o componente estrutural maioritário do exosqueleto dos invertebrados (principalmente nos crustáceos) e da parede celular dos fungos (Shahidi *et al.*, 1999). No caso dos exoesqueletos de crustáceos, são constituídos por cerca de 15-40% de quitina, 20-40% de proteínas e 20-50% de carbonato de cálcio; os pigmentos e outros sais são componentes minoritários (Kurita, 2006).

Uma vez que a biodegradação da quitina é um processo bastante lento, a acumulação de grandes quantidades de resíduos, provenientes do processamento dos crustáceos, tem-se tornado uma preocupação por parte da indústria alimentar que manipula este tipo de alimentos (Shahidi *et al.*, 1999). Existem diversas áreas (têxtil, alimentar, ecologia e investigação) interessadas em reaproveitar estes resíduos, com o intuito de minimizar os problemas ambientais. Os isolados de quitina diferem uns dos outros em vários aspectos, nomeadamente, grau de acetilação (aproximadamente 90 %) e, consequentemente, quantidade de azoto, massa molecular e polidispersidade. A massa molecular média da quitina *in vivo* é de, aproximadamente, 1000 kDa, embora os isolados de quitina apresentem valores mais baixos devido à despolimerização que ocorre durante

os tratamentos químicos de desproteinização e despigmentação. A quitina é menos solúvel do que a celulose, devido ao facto de a quitina ser um polímero cristalino. A cristalinidade da quitina resulta do estabelecimento de interações por pontes de hidrogénio entre os grupos acetilamida (Phillips e Williams, 2000a).

Quitosano é o nome usado para a forma menos acetilada da quitina, sendo constituído principalmente por glucosamina, 2-amino-2-desoxi- $\beta$ -D-glucose, tal como está representado na figura 3 (Shahidi *et al.*, 1999).

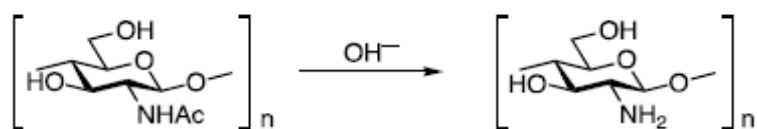


**Figura 3** – Estrutura do quitosano

O quitosano possui três tipos de grupos reactivos: um grupo amina, grupos hidroxilo primários e secundários nas posições C-2, C-3 e C-6, respectivamente. A modificação química destes grupos tem dado origem a materiais com aplicações muito interessantes. Devido ao facto de o monómero de glucosamina se encontrar carregado positivamente na posição C-2 a pH <6, o quitosano é mais solúvel e tem maior actividade antimicrobiana do que a quitina (Shahidi *et al.*, 1999). No entanto, é apenas solúvel em soluções aquosas a pH ácido, excepto as amostras de baixa massa molecular, para as quais se consegue a sua solubilização em água. A solubilidade do quitosano em meio aquoso ácido está relacionada com a protonação do grupo amina presente nas unidades de glucosamina (Phillips e Williams, 2000a). Alguns ácidos orgânicos, tais como, ácido fórmico, acético, láctico, pirúvico e oxálico são frequentemente utilizados para se proceder à sua dissolução (Kurita, 2006). A estrutura policatiónica do quitosano é única, uma vez que os outros polissacarídeos são normalmente neutros ou aniónicos (Phillips e Williams, 2000a).

### 1.3.2 Obtenção

O quitosano é obtido a partir da quitina, através de um processo de desacetilação. A desacetilação da quitina é levada a cabo por hidrólise dos grupos acetilamida em meio alcalino forte e a temperaturas elevadas (Figura 4). Normalmente, a reacção é efectuada em fase heterogénea, recorrendo a soluções concentradas de NaOH ou KOH (40-50%), e aplicando temperaturas superiores a 100°C. É ainda de salientar que a desacetilação deve ser realizada em atmosfera inerte ou na presença de agentes redutores, tais como, NaBH<sub>4</sub> ou tiofenol para evitar a despolimerização do polímero (Covas, 2006).



**Figura 4** – Reacção de desacetilação da quitina dando origem ao quitosano

As condições da reacção dependem de diversos factores, nomeadamente, do tipo de amostra inicial de quitina, do tratamento a que foi previamente submetida e do grau de desacetilação desejado. Pode-se afirmar que, com a realização de apenas um tratamento alcalino, consegue-se obter no máximo um grau de desacetilação de 75-85%. O prolongamento da reacção de desacetilação, pode provocar a degradação do polímero e não o aumento do grau de desacetilação (Covas, 2006).

Uma vez que a quitina é um polímero semi-cristalino, a reacção de desacetilação ocorre fundamentalmente nas regiões amorfas. Quando a reacção de desacetilação é efectuada em condições homogéneas, consegue-se promover uma desacetilação mais uniforme do polímero, diminuindo a polidispersidade das amostras obtidas. Para que tal aconteça, é necessário utilizar soluções alcalinas mais diluídas (25-40%), durante cerca de 12 a 24 horas (Covas, 2006).

É ainda importante salientar que, têm sido exploradas novas metodologias que permitam desacetilar a quitina, as quais baseiam-se na utilização de radiação microondas (Peniche *et al.*, 1993) ou em tratamentos termo-mecânicos (Peniche *et al.*, 1993a).

### 1.3.3 Aplicações

O quitosano é um polissacarídeo não tóxico, biocompatível e biodegradável. Contrariamente à celulose, trata-se de um polissacarídeo aminado apresentando propriedades biológicas, farmacológicas e fisiológicas bastante interessantes. A sua bioactividade deve-se ao facto de ser considerado um agente cicatrizante, de estimular o sistema imunitário, de ter actividades hipolipídica, mucoadesiva e antimicrobiana (Kumar, 2000).

Devido ao facto de o quitosano apresentar uma estrutura policationica, trata-se de um agente coagulante bastante eficaz, sendo assim frequentemente utilizado no tratamento de águas residuais; esta sua acção faz-se sentir principalmente na remoção de proteínas e cationes metálicos (Shahidi *et al.*, 1999; Kumar, 2000). Embora este polímero seja mais caro do que alguns polímeros policationicos sintéticos, tem a vantagem de ser biodegradável e não tóxico, ou seja, é “amigo do ambiente” (Kurita, 2006).

Este polímero tem a capacidade de funcionar como agente quelante, uma vez que possui alguns grupos amina livres que permitem a ligação de cationes metálicos ao mesmo (cobre, mercúrio, cádmio, ferro, manganês, níquel, zinco, chumbo e prata). O quitosano consegue ainda adsorver hidrocarbonetos aromáticos e proteínas. É de notar que a capacidade de adsorção do quitosano encontra-se dependente do grau de desacetilação, aumentando com o aumento do grau de desacetilação (Kurita, 2006).

Nos últimos anos têm sido desenvolvidas aplicações biomédicas com base na quitina e quitosano (Hirano, 1999). Isto porque são polímeros naturais, biodegradáveis, biocompatíveis e não tóxicos (Santos, 2006a). Entre várias aplicações biomédicas, destacam-se os revestimentos de feridas actuando como barreiras mecânicas e como aceleradores do processo de cicatrização, a produção de lentes de contacto, membranas artificiais, libertação controlada de fármacos, aplicações ortopédicas; também foi demonstrado que o quitosano actua como agente homostático, reduzindo consideravelmente o tempo de hemorragia (Kumar, 2000).

Actualmente, encontram-se disponíveis no mercado, diversos produtos que contêm quitosano: nutracêuticos, filmes/revestimentos de quitosano, cosméticos, produtos com aplicações médicas, aplicações na agricultura, como agente floculante, têxteis e papel. As proporções de participação no mercado estão representadas na tabela 7 (Santos, 2006).

**Tabela 7 – Aplicação do quitosano em diversas áreas**

<b>Aplicação</b>	<b>Proporção de participação no mercado (%)</b>
Nutracêuticos	50
Agente flocculante	17
Alimentar	10
Cosméticos	5
Agricultura	5
Têxteis, papel e produtos médicos	13

Em 1983, USFDA (United States Food and Drug Administration) aprovou o quitosano como aditivo alimentar. Em certos países, o quitosano é utilizado na indústria alimentar com o intuito de aumentar a qualidade dos produtos e de lhes conferir propriedades funcionais adicionais. No Japão, são produzidos biscoitos e batatas fritas enriquecidos com quitosano, devido ao seu efeito hipocolesterolémico. Determinadas características destes biopolímeros, tais como, não serem digeridos no tracto gastrointestinal, viscosidade elevada, a própria natureza do polímero associada a uma elevada capacidade de absorção de água, são responsáveis pelo potencial efeito dos mesmos como fibra dietética e, consequentemente, têm um efeito hipocolesterolémico (Shahidi *et al.*, 1999).

O modo de acção do quitosano como fibra dietética parece revestir-se de características específicas. Quando é dissolvido no estômago, o quitosano dá origem a uma emulsão com as gotículas de gordura intragástricas; de seguida dá-se a precipitação das mesmas no intestino delgado a pH 6,5-6,8. À medida que as cadeias poliméricas se começam a agregar, capturam as gotículas de gordura no interior da matriz, pelo que estas passam intactas através do lúmen e, por fim, são expelidas pelas fezes (Agulló *et al.*, 2003).

Outra área de aplicação agro-alimentar é a da clarificação de sumos de fruta. Este processo normalmente envolve o uso de reagentes clarificantes, tais como, gelatina, bentonite, taninos, caseínatos de potássio e polivinil pirrolidona. Uma vez que o quitosano é um polissacarídeo carregado positivamente, também tem sido utilizado com este fim; o quitosano é ainda capaz de controlar a acidez dos sumos de fruta (Shahidi *et al.*, 1999).

A utilização de filmes e revestimentos pode constituir um meio suplementar ou até mesmo essencial, para o controlo das alterações fisiológicas, morfológicas e físico-químicas dos produtos alimentares (Shahidi *et al.*, 1999). Correntemente, eram produzidos filmes à base de celulose ou de proteínas e derivados. Estes filmes conseguiam promover a diminuição da pressão parcial do oxigénio e do dióxido de carbono, embora não fossem boas barreiras para o vapor de água. Deste modo, começaram a ser procurados novos polímeros, que permitissem obter filmes comestíveis com propriedades mais interessantes. Devido à sua capacidade para formar filmes semipermeáveis, o quitosano tem sido usado com muito sucesso para revestir produtos alimentares, aumentando o tempo de prateleira dos mesmos (Agulló *et al.*, 2003; Shahidi *et al.*, 1999). Os filmes de quitosano são rígidos, embora flexíveis, pelo que são considerados filmes relativamente resistentes. Para além disso, apresentam uma permeabilidade ao vapor de água moderada, são eficientes barreiras para o oxigénio, diminuindo assim a taxa de respiração, atrasando o processo de amadurecimento de frutos e vegetais (devido à redução da concentração de etileno e dióxido de carbono libertado).

Por outro lado, os filmes de quitosano inibem o desenvolvimento de microrganismos à superfície dos alimentos (Agulló *et al.*, 2003). O mecanismo de acção como agente antimicrobiano ainda não se encontra bem conhecido. No entanto, pensa-se que se deve à interacção entre as cargas positivas das moléculas de quitosano e as cargas negativas das membranas celulares, o que conduz à ruptura da membrana e consequente libertação de vários constituintes intracelulares. Outra possibilidade estará relacionada com o facto de o quitosano também funcionar como agente quelante, ligando-se selectivamente aos metais, inibindo a produção de toxinas e o desenvolvimento microbiano. Na tabela 8 encontram-se referidas, resumidamente, as possíveis aplicações da quitina, quitosano e derivados na indústria alimentar (Shahidi *et al.*, 1999).



**Tabela 8** – Aplicações da quitina, quitosano e derivados na indústria alimentar

<i>Área de aplicação</i>	<i>Exemplos</i>
<i>Agente antimicrobiano</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>✓ Bactericida</li><li>✓ Fungicida</li></ul>
<i>Filmes comestíveis</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>✓ Controlo da transferência de humidade, entre os alimentos e o ambiente</li><li>✓ Libertação controlada de:<ul style="list-style-type: none"><li>• substâncias antimicrobianas</li><li>• antioxidantes</li><li>• nutrientes, aromas e drogas</li></ul></li><li>✓ Redução da pressão parcial de oxigénio</li><li>✓ Controlo da:<ul style="list-style-type: none"><li>• taxa de respiração</li><li>• temperatura</li><li>• oxidação enzimática de frutos</li></ul></li></ul>
<i>Aditivo</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>✓ Clarificação e desacidificação de frutos e bebidas</li><li>✓ Intensificador de sabor</li><li>✓ Controlador de textura</li><li>✓ Agente emulsionante</li><li>✓ Agente estabilizador de cor</li></ul>
<i>Qualidade nutricional</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>✓ Fibra dietética</li><li>✓ Efeito hipocolesterémico</li><li>✓ Aditivo de comida para peixes</li><li>✓ Redução da absorção de lípidos</li></ul>
<i>Recuperação de materiais sólidos de águas residuais da indústria alimentar</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>✓ Agente floculante</li><li>✓ Fraccionamento de agar</li></ul>
<i>Purificação de águas</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>✓ Recuperação de iões metálicos, pesticidas e fenóis</li><li>✓ Remoção de corantes</li></ul>
<i>Outras aplicações</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>✓ Imobilização de enzimas</li><li>✓ Encapsulamento de nutracêuticos</li></ul>

#### 1.3.4 Oligoquitosanos

Embora o quitosano tenha importantes actividades biológicas, a sua utilização na indústria alimentar e aplicações biomédicas são limitadas pela sua baixa solubilidade em água. Contrariamente ao quitosano, os oligoquitosanos normalmente são solúveis em água (devido à sua baixa massa molecular e à presença de resíduos de D-glucosamina com o grupo amina livre), pelo que são facilmente absorvidos pelo intestino e, posteriormente, entram na corrente sanguínea; por consequência, os efeitos biológicos destes derivados do quitosano no organismo humano fazem-se sentir de forma mais intensa (Kim e Rajapakse, 2005). Relativamente aos benefícios para a saúde humana, podem-se referir a capacidade de redução dos níveis de colesterol no sangue, redução da pressão arterial, protecção contra infecções e propriedades antitumorais e imunoestimuladoras (Kim e Rajapakse, 2005; Cabrera e Cutsem, 2005). É de salientar que a actividade biológica destes oligómeros depende essencialmente da estrutura e massa molecular dos mesmos (Jeon *et al.*, 2000).

Diferentes protocolos têm vindo a ser desenvolvidos com o intuito de produzir oligoquitosanos, sendo a despolimerização química e enzimática do quitosano os mais referenciados (Cabrera e Cutsem, 2005). No entanto, a despolimerização química apresenta algumas desvantagens, nomeadamente, a produção de alguns compostos tóxicos associados à poluição ambiental e os baixos rendimentos (Kim e Rajapakse, 2005). Assim, o método mais utilizado para a produção de oligoquitosanos com uma massa molecular específica consiste na despolimerização do quitosano de elevada massa molecular através da acção de enzimas, uma vez que a síntese destes compostos é um processo extremamente difícil de levar a cabo. Deste modo, para combater esta limitação, recorre-se frequentemente a enzimas específicas (quitosanases) e não-específicas. Devido à reduzida disponibilidade e elevado custo das quitosanases, estas enzimas específicas não são muito usadas à escala industrial (Li *et al.*, 2007). Como alternativa, começaram a ser usadas enzimas não específicas para catalizar a clivagem das ligações glicosídicas do quitosano, entre as quais se destacam proteases, hemicelulases, lipases e pectinases (Cabrera e Cutsem, 2005). Estas enzimas, para além de serem baratas e de se encontrarem facilmente disponíveis, possibilitam maiores rendimentos na produção dos oligoquitosanos (Li *et al.*, 2007).

#### 1.3.4.1 Actividade antimicrobiana

A actividade antimicrobiana deste tipo de compostos é influenciada por diversos factores, tais como, grau de polimerização, grau de desacetilação, tipo de microrganismo (Kim e Rajapakse, 2005), massa molecular e concentração (Liu *et al.*, 2006). Alguns autores referem que os oligoquitosanos devem apresentar uma massa molecular superior a 10000 Da para terem um efeito antimicrobiano. A concentração mínima de quitosano necessária para inibir os microrganismos varia entre 0,005 e 0,1%, dependendo das espécies de bactérias, da massa molecular do quitosano e do pH da solução (Liu *et al.*, 2006).

Contrariamente à quitina, o quitosano e os oligoquitosanos possuem nas suas estruturas grupos amina primários. O número destes grupos amina desempenham um papel fundamental na actividade antimicrobiana, tendo sido propostos vários mecanismos para descrever este tipo de actividade (Kim e Rajapakse, 2005). O mecanismo mais aceite (descrito anteriormente) consiste no facto dos grupos amina primários provocarem a alteração da permeabilidade característica da membrana celular do microrganismo, provocando a ruptura da mesma com consequente libertação de vários constituintes intracelulares, conduzindo à morte do microrganismo (Chen *et al.*, 2002).

#### 1.3.4.2 Actividade antitumoral

Os oligoquitosanos têm a capacidade de inibir o desenvolvimento de células tumorais através do desencadeamento de efeitos imunoestimuladores (Jeon *et al.*, 2000). Alguns autores sugerem que a actividade antitumoral observada não é devida à destruição directa das células tumorais, mas sim ao aumento da produção de linfocinas, facto que vai conduzir à proliferação de linfócitos-T citolíticos (Kim e Rajapakse, 2005). Inicialmente pensava-se que este tipo de actividade fosse devida essencialmente às cargas positivas dos grupos amina primários (Huang *et al.*, 2006); posteriormente, chegou-se à conclusão que a actividade antitumoral desempenhada pelos oligoquitosanos encontra-se principalmente dependente das suas características estruturais, tais como, grau de desacetilação e massa molecular (Huang *et al.*, 2006; Kim e Rajapakse, 2005).

#### 1.3.4.3 Actividade antioxidante

Nos últimos anos, o interesse por antioxidantes naturais tem vindo a aumentar, uma vez que estes têm a capacidade de proteger o organismo humano dos radicais livres, conseguindo com isto retardar o aparecimento de doenças crónicas (Xing *et al.*, 2005). Os antioxidantes podem actuar a diferentes níveis da cadeia oxidativa. Tal pode ser ilustrado, considerando um de muitos mecanismos através dos quais o stress oxidativo pode causar danos, devido à estimulação da oxidação lipídica. Estas reacções de oxidação em cadeia podem ser inibidas através da adição de antioxidantes, pois estes agentes conseguem retardar o efeito dos radicais livres. Isto porque, os antioxidantes reagem com os radicais livres (impedindo que estes reajam com os lípidos), removendo-os do meio reaccional (Park *et al.*, 2003).

A oxidação lipídica é um assunto que preocupa bastante, tanto a indústria alimentar como o consumidor, uma vez que estas reacções dão origem a produtos potencialmente tóxicos e a produtos com um aroma indesejável (Park *et al.*, 2003).

Alguns antioxidantes sintéticos têm sido adicionados aos produtos alimentares, com o intuito de retardar os processos de oxidação lipídica. No entanto, a sua utilização está sob regulamentação restrita, devido aos potenciais perigos para a saúde humana (Park *et al.*, 2003). Com isto surgiu a necessidade de encontrar novos compostos naturais com actividade antioxidante, pelo que foi iniciada a exploração de habitats aquáticos, descobrindo-se assim que as plantas marinhas e os invertebrados também continham antioxidantes (Wang *et al.*, 2007; Xing *et al.*, 2005).

Muitos compostos biológicos, tais como, hidratos de carbono, peptídeos e alguns compostos fenólicos, têm sido considerados agentes antioxidantes bastante eficazes. Mais recentemente, o quitosano e seus derivados têm sido alvos de vários estudos, devido à actividade antioxidante que desempenham (Kim e Rajapakse, 2005). Segundo Wang *et al.*, 2007, os oligoquitosanos apresentam uma elevada capacidade de captar os radicais hidroxilo, superóxido e peróxido de hidrogénio. Para além disto, conseguem quelar com  $\text{Fe}^{2+}$  e previnem a ocorrência da oxidação lipídica. É ainda de salientar que a actividade antioxidante dos oligoquitosanos também se encontra dependente do seu grau de desacetilação e massa molecular (Kim e Rajapakse, 2005).

#### ***1.4 Filmes constituídos por proteínas e polissacarídeos***

Nesta secção apresenta-se uma breve revisão do conhecimento actual acerca de filmes constituídos por proteínas e polissacarídeos, já que o principal objectivo deste trabalho é o de se conseguirem propriedades atractivas e melhoradas para filmes bi-componentes constituídos por quitosano e proteínas do soro do leite.

Os filmes constituídos por proteínas apresentam boas propriedades mecânicas, devido às interacções estabelecidas entre as cadeias proteicas, tais como, ligações por pontes dissulfureto, pontes de hidrogénio, interacções electrostáticas e hidrofóbicas. No entanto, estes filmes são muito permeáveis ao vapor de água. Possíveis estratégias para otimizar tais características podem passar pela alteração estrutural do polímero em questão ou pela alteração da composição do filme através da adição de novos componentes.

Por exemplo, quer a irradiação com raios gama quer a adição de polissacarídeos como amido ou alginato podem levar à alteração quer das propriedades barreira quer das propriedades mecânicas de filmes de WPI (Ciesla *et al.*, 2006).

Segundo Prodpran *et al.* (2007) para melhorar a permeabilidade ao vapor de água dos filmes de proteína, podem-se adicionar moléculas hidrofóbicas, enquanto que para melhorar as propriedades mecânicas podem-se incorporar outros biopolímeros miscíveis, como por exemplo, o quitosano. Estes autores referem que, através da adição de uma determinada quantidade de quitosano (0, 10, 25 e 40%) à solução de proteínas do músculo de peixe (solução com concentração inicial de 2%) como substituinte, conseguiu-se melhorar as propriedades mecânicas dos filmes (aumento da resistência mecânica com o aumento da concentração de quitosano), provocando contudo um ligeiro aumento da permeabilidade ao vapor de água (devido à sua natureza hidrofílica).

Também no caso das proteínas do soro do leite foram efectuados vários trabalhos de investigação no sentido de otimizar as propriedades dos filmes de WPI, recorrendo à incorporação de polissacarídeos na matriz proteica. Segundo alguns autores, a adição de pequenas quantidades de polissacarídeos (carboximetilcelulose, pectinas, agar) à matriz proteica (cerca de 50 g/Kg de proteína), facilita a formulação dos mesmos e, ainda, provoca o aumento da resistência mecânica e uma melhoria das propriedades de barreira

(Le Tien *et al.*, 2000; Letendre *et al.*, 2002). Foi demonstrado que é possível formar filmes constituídos por quitosano e proteínas do soro do leite, tanto na presença como na ausência da enzima transglutaminase microbiana, a qual foi usada como agente de entrecruzamento entre as cadeias de proteína. A presença desta enzima induziu o aumento da resistência mecânica e, conseqüentemente, a redução da taxa de deformação dos filmes; também se chegou à conclusão de que a transglutaminase contribuiu para a melhoria da permeabilidade ao oxigênio e dióxido de carbono, bem como para a diminuição da permeabilidade ao vapor de água. Com isto, pode-se concluir que os filmes de quitosano e WPI formados na presença da enzima possuem melhores propriedades mecânicas e de barreira do que os filmes formados na sua ausência (Di Pierro *et al.*, 2006).

De acordo com Gouna *et al.* (2007), é possível otimizar algumas propriedades dos filmes de WPI (permeabilidade ao vapor de água e ao oxigênio, humidade, solubilidade e morfologia), através da adição de pululanos à matriz proteica. Estes autores chegaram à conclusão que filmes de WPI e pululanos na proporção 1:1, apresentavam melhores propriedades do que os restantes filmes preparados: 1:0, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 8:1 e 10:1 (WPI:pululanos), passando estes a ter características mais interessantes para uma potencial aplicação como revestimento de alimentos.



## ***2. Materiais e Métodos***

---



## ***2.1 Materiais***

A amostra de isolado de proteínas do soro do leite (WPI) utilizada neste estudo (BiPRO, 97.7% de proteínas, 0.3% de gordura, 1.8% de cinzas), foi gentilmente cedida pela Davisco Foods International (Le Sueur MN, USA). A amostra de quitosano comercial de massa molecular média com um grau de desacetilação mínimo de 85%, foi proveniente da Sigma-Aldrich. O glicerol, utilizado como agente plastificante foi igualmente obtido da Sigma-Aldrich. O ácido acético (pureza mínima: 99,8%) foi proveniente da Riedel-de-Häen. Os oligoquitosanos incorporados nos filmes de WPI consistiram numa amostra comercial, cedida pela Universidade Católica Portuguesa (Porto), caracterizada por uma massa molecular média de cerca 1659 Da (determinada por GPC).

## ***2.2 Métodos***

### **2.2.1 Ensaios preliminares – Efeito do pH e da quantidade de quitosano**

Realizaram-se ensaios preliminares para definir condições de compatibilidade entre as proteínas e o polissacarídeo. Para isso, em cada um de 4 tubos de ensaio adicionaram-se 3 mL de solução WPI 8 % (m/v), a pH 7, e 1, 3, 4, e 6 mL, respectivamente, de solução de quitosano 1 % (m/v). O mesmo teste foi efectuado com solução de WPI 8 % a pH 3.

### **2.2.2 Formulação de filmes de WPI a pH ácido**

Para a preparação de filmes de WPI a pH ácido, ajustou-se o valor de pH (para o valor pretendido) de uma solução de WPI 10-12 %, com ácido acético. Seguidamente, aqueceu-se a solução de WPI a 80°C durante 30 minutos, de modo a promover a desnaturação das proteínas. Adicionou-se, à solução de WPI ainda quente, glicerol, na proporção 2:1 (proteína:glicerol), como agente plastificante. Deixou-se arrefecer até atingir a temperatura ambiente e filtrou-se a mistura, sob vácuo, através de um filtro de placa porosa e, posteriormente, procedeu-se à desgaseificação da mistura aplicando vácuo. Colocaram-se diferentes quantidades da mistura em placas de acrílico com uma área de

139 cm<sup>2</sup>. Posteriormente, deixou-se evaporar o solvente durante 16 horas, aproximadamente, em estufa com circulação de ar a 30°C.

### **2.2.3 Formulação dos filmes de quitosano a pH 3,5**

Preparou-se uma solução de quitosano 2 % em ácido acético 0,1 mol/L, deixando-se em agitação à temperatura ambiente. De seguida, ajustou-se o pH desta solução para 3,5 com uma solução de ácido acético 2 mol/L, pelo que a solução ficou com uma concentração final de 1,5 %. Adicionou-se glicerol como plastificante na proporção 1:10 (glicerol:quitosano) e deixou-se em agitação moderada num banho a 50 °C durante cerca de 10 minutos. Arrefeceu-se a solução em agitação moderada durante 30 minutos, filtrou-se através de um filtro de placa porosa e desgaseificou-se, sob vácuo. Transferiu-se uma determinada massa de solução para placas de acrílico de 139 cm<sup>2</sup>, as quais foram previamente colocadas num suporte e niveladas, de modo a que cada filme seja constituído por  $3,3 \times 10^{-3}$  g quitosano/cm<sup>2</sup>. Os filmes foram obtidos através da evaporação do solvente em estufa com circulação de ar a 30 °C durante cerca de 16 horas. A remoção dos mesmos foi efectuada por destacamento.

### **2.2.4 Formulação de filmes de quitosano e WPI a pH 3,5**

Preparou-se uma solução de quitosano (como se encontra descrito no ponto anterior) e uma solução de WPI 5 % em água ultra-pura deixando-se em agitação moderada à temperatura ambiente. Ajustou-se o pH para 3,5 com uma solução de ácido acético 2 mol/L, pelo que esta solução ficou com uma concentração final de 4 %. A solução de WPI foi colocada num banho de água, a 80°C durante 30 minutos, de modo a promover a desnaturação das proteínas. De seguida, procedeu-se à mistura das duas soluções nas seguintes proporções: 6:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2 e 1:3, quitosano e proteína, respectivamente. O glicerol foi igualmente adicionado na proporção de 1:10 (glicerol:polímero total). As misturas foram colocadas num banho, com agitação moderada, a 50 °C durante cerca de 10 minutos. Deixou-se arrefecer a solução em agitação moderada durante 30 minutos, filtrou-se através de um filtro de placa porosa e desgaseificou-se, sob vácuo. Transferiu-se uma determinada massa das misturas para placas de acrílico de 139 cm<sup>2</sup>, de modo a manter a quantidade total de polímero por

unidade de área ( $3,3 \times 10^{-3}$  g polímero total/cm<sup>2</sup>). Os filmes foram obtidos tal como foi descrito no ponto anterior.

### **2.2.5 Formulação de filmes de WPI a pH 7**

Preparou-se uma solução de WPI 12 % em água ultra-pura, deixando-se em agitação à temperatura ambiente durante a noite. De seguida, procedeu-se ao ajuste do pH da solução para 7 e diluiu-se a mesma com água ultra-pura, de modo a ficar com uma concentração final de 10 %. Adicionou-se o glicerol como plastificante na proporção (2:1) (WPI:glicerol) e promoveu-se a desnaturação das proteínas, a 80 °C durante 30 minutos. Deixou-se arrefecer a solução em agitação moderada até atingir a temperatura ambiente, filtrou-se através de um filtro de placa porosa e desgaseificou-se sob vácuo. Transferiram-se 12 g da solução para placas de acrílico de 139 cm<sup>2</sup>, as quais foram previamente colocadas num suporte e niveladas, de modo a que cada filme seja constituído por  $8,6 \times 10^{-3}$  g proteína/cm<sup>2</sup>. Os filmes foram obtidos através da evaporação do solvente na estufa a 30 °C durante cerca de 16 horas. A remoção dos mesmos foi efectuada por destacamento.

### **2.2.6 Formulação de filmes de WPI e oligoquitosanos a pH 7**

Preparou-se uma solução de WPI 12 % em água ultra-pura, deixando-se em agitação à temperatura ambiente durante a noite. De seguida, procedeu-se ao ajuste do pH da solução para 7 e diluiu-se a mesma com água ultra-pura, de modo a ficar com uma concentração final de 10 %. Adicionou-se o glicerol como plastificante na proporção (2:1) (WPI:glicerol) e os oligoquitosanos nas seguintes proporções: 100:1, 75:1, 50:1. Verificou-se que para proporções mais elevadas de oligoquitosanos ocorria precipitação, provavelmente devido a interacções electrostáticas significativas entre os dois biopolímeros. Promoveu-se a desnaturação das proteínas na presença dos oligoquitosanos, a 80 °C durante 30 minutos (a desnaturação foi levada a cabo na presença dos oligoquitosanos porque, após a realização de uns ensaios preliminares, concluiu-se que estes não se dissolviam na solução de WPI previamente desnaturada). Deixou-se a solução arrefecer em agitação moderada até atingir a temperatura ambiente, filtrou-se através de um filtro de placa porosa e desgaseificou-se sob vácuo. Transferiram-se 12 g da mistura

para placas de acrílico de  $139\text{ cm}^2$ , as quais foram previamente colocadas num suporte e niveladas, de modo a que cada filme seja constituído por  $8,6 \times 10^{-3}\text{ g proteína/cm}^2$ . Os filmes foram obtidos através da evaporação do solvente na estufa a  $30\text{ }^\circ\text{C}$  durante cerca de 16 horas. A remoção dos mesmos foi efectuada por destacamento.

## **2.2.7 Caracterização dos filmes preparados**

### 2.2.7.1 Determinação das propriedades mecânicas

Os filmes preparados anteriormente foram cortados em amostras rectangulares com as seguintes dimensões:  $9 \times 1\text{ cm}$ . Estas amostras foram acondicionadas numa câmara com uma solução saturada de nitrato de magnésio, sob condições controladas de humidade e temperatura ( $50 \pm 5\%$  de humidade relativa e  $22 \pm 5\text{ }^\circ\text{C}$  de temperatura), durante cerca de 48 horas. Após o acondicionamento, procedeu-se à medição da espessura das amostras, utilizando um micrómetro digital (Mitutoyo Corp., Tóquio, Japão), e da largura com um picómetro.

Efectuaram-se ensaios de tensão até à ruptura do filme num texturómetro TA-Hdi (Texture Analyser da Stable Micro Systems). As amostras foram colocadas na vertical entre duas garras revestidas com borracha, deixando cerca de  $5\text{ cm}$  de filme exposto. Foram analisadas 9 réplicas por cada tipo de filme.

Os ensaios de tensão até à ruptura basearam-se no método padrão ASTM D 882-83. Os filmes foram submetidos a uma deformação extensional devido à aplicação de uma taxa de deslocamento de  $0,5\text{ mm/s}$  até à ruptura da amostra. Através das curvas de tensão *versus* deformação obtidas, calcularam-se os seguintes parâmetros mecânicos: tensões no ponto da ruptura e de cedência, alongamento no ponto da ruptura e módulo de Young. Estes ensaios foram realizados a uma temperatura de  $24 \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$  e  $45 \pm 5\%$  de humidade relativa.

### 2.2.7.2 Determinação da permeabilidade ao vapor de água (WVP)

Para a determinação da permeabilidade ao vapor de água recorreu-se ao método padrão ASTM 96-95.

Os filmes preparados anteriormente foram cortados em amostras circulares com  $6\text{ cm}$  de diâmetro. De seguida, mediu-se a espessura de cada amostra utilizando o micrómetro digital (Mitutoyo Corp., Tóquio, Japão), tendo estas sido posteriormente

acondicionadas a uma temperatura de  $22\pm 5$  °C e humidade relativa de  $50\pm 5$  % durante cerca de 48 horas (numa câmara com solução saturada de nitrato de magnésio).

Para a realização destes ensaios utilizaram-se caixas circulares em polimetilmetacrilato, com as seguintes dimensões: 8 cm de diâmetro externo, 2 cm de altura externa, 5 cm de diâmetro interno e 1,8 cm de altura interna. A face superior das caixas possui 4 parafusos embutidos para roscas de orelhas. As amostras foram fixadas na superfície superior das caixas circulares com o auxílio de um anel de fixação e silicone, nas quais já se tinham previamente colocado cerca de 16 g de cloreto de cálcio anidro, de modo a ficar com cerca de 0,6 cm de altura entre o filme e o  $\text{CaCl}_2$  (0 % humidade relativa). O cloreto de cálcio anidro foi previamente seco na mufla a 200 °C durante cerca de 2 horas. A área exposta de cada filme foi igual a  $19,6 \text{ cm}^2$ .

As caixas com as amostras foram rigorosamente pesadas e, posteriormente, colocadas numa câmara fechada com circulação de ar devido à incorporação de uma ventoinha (com uma velocidade de circulação de ar de aproximadamente 152 m/min). No interior da câmara encontrava-se uma solução saturada de nitrato de magnésio, conseguindo-se deste modo controlar a humidade relativa no interior da mesma ( $44\pm 2$  % de humidade relativa e  $24\pm 2$  °C de temperatura). A medição da humidade relativa e da temperatura no interior da câmara foi efectuada com higrómetro/termómetro digital (Termo Hygro, Cole Parmer). As caixas com as amostras foram pesadas de hora em hora durante 8 horas. Foram realizadas 3 réplicas para cada tipo de filme e, uma vez que os filmes em questão apresentavam duas superfícies diferentes, os ensaios de permeabilidade foram efectuados expondo tanto a superfície superior como a superfície inferior à humidade relativa no interior da câmara.

A taxa de transmissão do vapor de água (WVTR) ( $\text{g/h m}^2$ ) foi determinada a partir da equação 1:

$$\text{WVTR} = \text{Declive} / \text{Área do filme exposto} \quad (\text{Equação 1})$$

Através da análise linear do ganho de massa em função do tempo conseguiu-se determinar o declive correspondente a cada réplica. Os coeficientes de correlação obtidos variaram de 0,999 a 0,990.

A permeabilidade ao vapor de água (WVP) ( $\text{g mm/h m}^2 \text{ kPa}$ ) foi determinada através da equação 2:

$$\text{WVP} = (\text{WVTR}/\Delta P) \times \text{espessura do filme} \quad (\text{Equação 2})$$

em que  $\Delta P = S \times (R_1 - R_2)$ , sendo o  $S$  a pressão de saturação de vapor à temperatura do ensaio (kPa),  $R_1$  a humidade relativa na câmara e  $R_2$  a humidade relativa no interior da caixa que contém o  $\text{CaCl}_2$ . Por sua vez, a pressão de saturação de vapor foi calculada através da equação 3:

$$S = 0,61078 \exp (17,269T/T+237,3) \quad (\text{Equação 3})$$

#### 2.2.7.3 Determinação do ângulo de contacto

O ângulo de contacto foi determinado através de um sistema de avaliação da energia da superfície, comercializado pela Universidade de Brno (República Checa). Utilizou-se como líquido de teste a água destilada. Colocou-se uma gota de água destilada ( $10 \mu\text{L}$ ) na superfície do filme. A evolução da forma da gota foi gravada com uma câmara associada ao sistema. O cálculo dos ângulos de contacto foi efectuado a partir do software de análise de imagens. Este parâmetro foi analisado nas duas superfícies de cada filme em estudo. Os valores finais correspondem à média de 10 determinações (colocaram-se 10 gotas de água destilada em diferentes locais do filme).

No caso dos filmes de WPI e oligoquitosanos a determinação do ângulo de contacto dos foi efectuada através do sistema de ângulos de contacto OCA 20 da Dataphysics, aproveitando a disponibilidade então verificada deste equipamento. Utilizou-se como líquido de teste a água destilada. Colocou-se uma gota de água destilada de  $3 \mu\text{L}$ , a qual foi automaticamente doseada por uma seringa, na superfície do filme. A evolução da forma da gota foi gravada com uma câmara associada ao sistema. O cálculo dos ângulos de contacto foi efectuado a partir do software de análise de imagens, segundo o método da circunferência. Os valores finais correspondem à média de 5 determinações (colocaram-se 5 gotas de água destilada em diferentes locais do filme).

#### 2.2.7.4 Análise por FTIR

Neste trabalho experimental recorreu-se à espectroscopia de infravermelho (FTIR – Fourier Transform Infrared) com o intuito de verificar a eventual ocorrência de gradientes de composição nos filmes preparados uma vez que, a “olho nu”, se constatou que as duas superfícies dos filmes eram diferentes.

Os espectros de FTIR dos diferentes filmes foram adquiridos na gama de números de onda entre 4000 e 500  $\text{cm}^{-1}$  com uma resolução de 8  $\text{cm}^{-1}$  num espectrómetro Bruker IFS com acessório Golden Gate (sistema de ATR (“Attenuated total reflection”, reflexão total atenuada)), com a acumulação de 256 scans. A análise dos espectros foi realizada recorrendo à “Análise em Componentes Principais” (PCA) com o software CATS desenvolvido por António Barros (1999).

#### 2.2.7.5 Análise por microscopia electrónica de varrimento (SEM)

A análise dos filmes de quitosano e WPI por microscopia electrónica de varrimento foi efectuada num microscópio electrónico de varrimento Hitachi SU-70 a 1,0 kV. As amostras foram fixadas em suportes de alumínio específicos. Para tal, recorreu-se à fita-cola de dupla face de carbono. De seguida, as amostras foram revestidas com carbono. Através deste tipo de microscopia analisaram-se as duas superfícies dos filmes, bem como a secção transversal.

### ***3.Resultados e Discussão***

---



### ***3.1 Ensaios preliminares – Efeito do pH e da quantidade de quitosano***

Quando se misturou a solução de WPI 8 % a pH 7 com as diferentes quantidades de solução de quitosano 1 % verificou-se a ocorrência de precipitação. Dado que o ponto isoeléctrico das proteínas do soro do leite é, aproximadamente, 5.2 (Anker *et al.*, 1998) e como a solução de WPI possuía um valor de pH superior ao ponto isoeléctrico das proteínas, isto significa que estas estariam carregadas negativamente. Logo, sendo o quitosano um polissacarídeo catiónico, a ocorrência de interações electrostáticas de natureza atractiva justifica o facto dos dois biopolímeros apresentarem uma tendência para formarem agregados nestas condições. Contrariamente, quando se utilizou a solução de WPI 8 % a pH 3, não ocorreu precipitação em nenhum dos casos, porque as proteínas encontravam-se positivamente carregadas. Por estes motivos, constatou-se que não seria possível proceder à formulação de filmes de WPI a pH 7, incorporando nesta matriz a amostra comercial de quitosano de massa molecular média. Portanto, decidiu-se tentar produzir filmes de WPI e quitosano a pH ácido.

### ***3.2 Formulação de filmes de WPI***

Tal como se encontra descrito na bibliografia (Anker *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2007), conseguiu-se formar filmes partindo de uma solução de WPI com pH 7.

Para estudar a influência do pH na formação de filmes de WPI a pH ácido, utilizaram-se soluções de WPI a diferentes valores de pH (2,3, 2,5, 3, 3,5 e 4). Os resultados obtidos para cada uma destas condições encontram-se resumidos na tabela 9.

**Tabela 9** – Resultados obtidos partindo de soluções de WPI com pH 4-2,3

Concentração da solução de WPI (%)	pH das soluções de WPI	Observações
11,2	4	Não se conseguiu obter um filme, pois a solução apresentava-se opaca devido à proximidade do pI das proteínas.
	3,5	Não se conseguiu destacar o filme da placa, devido ao facto de não apresentar consistência suficiente.
	3	
	2,5	
	2,3	Após a desnaturação da proteína, verificou-se a formação de um gel.

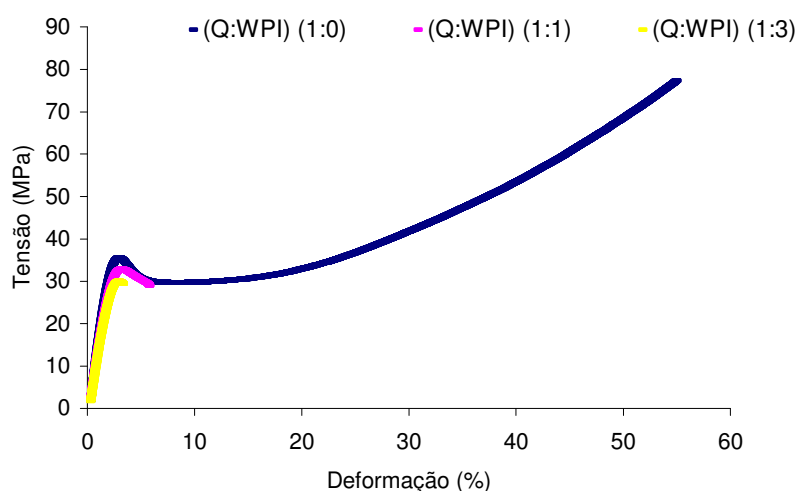
Verificou-se que em nenhuma das condições de pH descritas se conseguiu destacar um filme das placas de acrílico.

Considera-se que o facto de não se conseguir formar filmes a pH ácido será devido ao não estabelecimento de pontes dissulfureto entre as proteínas do soro do leite, pelo menos em número suficiente, a valores de pH < 6,5 (Cagri *et al.*, 2001), não permitindo assim obter filmes com propriedades mecânicas aceitáveis para a sua manipulação.

### 3.3 Caracterização dos filmes de quitosano e WPI pH 3,5

#### 3.3.1 Determinação das propriedades mecânicas

Para este tipo de materiais, os ensaios mecânicos mais usados são os ensaios de tensão. Neste tipo de ensaio, os filmes são submetidos a uma deformação crescente, devido à aplicação de uma determinada taxa de deslocamento, medindo-se a tensão resultante. Deste modo, obtêm-se curvas de tensão *versus* deformação, a partir das quais se podem determinar os seguintes parâmetros mecânicos: tensão no ponto de ruptura, tensão de cedência, módulo de Young e alongamento (% deformação) no ponto de ruptura. Na figura 5 estão exemplificadas algumas curvas de tensão *versus* deformação de três tipos de filmes preparados.



**Figura 5** – Curvas de tensão em função da deformação, correspondentes a filmes de quitosano e WPI nas seguintes proporções: 1:0, 1:1 e 1:3 (quitosano:WPI)

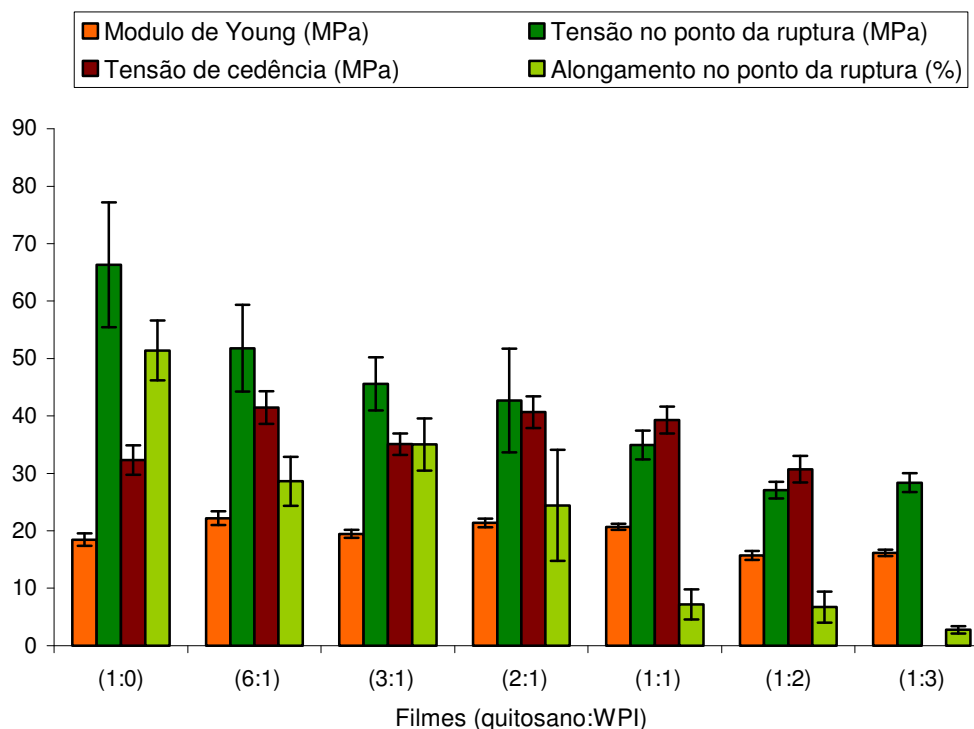
Na tabela 10 estão registados os parâmetros mecânicos obtidos, bem como a espessura dos filmes preparados.

**Tabela 10** – Parâmetros mecânicos e espessura dos filmes de quitosano e WPI nas diferentes proporções

Amostras (Q:WPI)	Módulo de Young ( $\times 10^2$ MPa)	Tensão no ponto de ruptura (MPa)	Tensão de cedência (MPa)	Deformação no ponto de ruptura (%)	Espessura (mm)
1:0	18,5 $\pm$ 1,1	66 $\pm$ 11	32 $\pm$ 2	51 $\pm$ 5	0,031 $\pm$ 0,002
6:1	22,2 $\pm$ 1,2	52 $\pm$ 6	41 $\pm$ 3	29 $\pm$ 4	0,031 $\pm$ 0,003
3:1	19,5 $\pm$ 0,7	46 $\pm$ 5	35 $\pm$ 2	35 $\pm$ 4	0,030 $\pm$ 0,003
2:1	21,4 $\pm$ 0,8	43 $\pm$ 9	41 $\pm$ 3	24 $\pm$ 10	0,027 $\pm$ 0,001
1:1	20,7 $\pm$ 0,5	35 $\pm$ 2	39 $\pm$ 2	7 $\pm$ 3	0,026 $\pm$ 0,001
1:2	15,8 $\pm$ 0,8	27 $\pm$ 1	31 $\pm$ 2	7 $\pm$ 3	0,030 $\pm$ 0,008
1:3	16,2 $\pm$ 0,5	28 $\pm$ 2	—	3 $\pm$ 1	0,020 $\pm$ 0,000

Os valores representados correspondem à média de 7 réplicas e respectivos desvios padrão

A partir dos ensaios de tensão realizados chegou-se à conclusão que a adição de quantidades crescentes de proteína à matriz de quitosano provocou a diminuição da tensão e do alongamento no ponto da ruptura, enquanto que o módulo de Young manteve-se essencialmente constante. No que diz respeito à tensão de cedência, pode-se afirmar que a presença de proteína origina um ligeiro aumento deste parâmetro mecânico, especialmente para composições intermédias. Uma vez que, a tensão e o alongamento no ponto da ruptura dão a indicação da força e da flexibilidade dos filmes, respectivamente, pode-se concluir que estes se tornam menos resistentes e flexíveis após a adição de proteína ao sistema (diminuição da resistência mecânica dos filmes com o aumento a quantidade de proteína). Este comportamento pode, eventualmente, dever-se ao facto de a adição de proteínas causar a disrupção da estrutura tridimensional do filme de quitosano. Os resultados obtidos encontram-se de acordo com Di Pierro *et al.*, 2006. Na figura 6 estão representadas as propriedades mecânicas determinadas, a partir das quais se pode constatar tudo o que foi mencionado anteriormente. Segundo Krochta and Mulder-Johnson (1997) os filmes têm propriedades mecânicas moderadas quando apresentam uma tensão no ponto da ruptura de 10-100 MPa e um alongamento no ponto da ruptura de 10-50 %. Deste modo, pode-se afirmar que apenas os filmes 1:0, 6:1, 3:1 e 2:1 apresentam propriedades mecânicas moderadas.



**Figura 6** – Parâmetros mecânicos dos filmes de quitosano e WPI nas diferentes proporções (quitosano:WPI); as barras de erro representam os desvios padrão correspondentes à média de 7 réplicas

### 3.3.2 Determinação da permeabilidade ao vapor de água (WVP)

A transferência de humidade é um dos factores mais importantes que contribuem para a alteração da qualidade dos alimentos durante o transporte e armazenamento. Valores críticos de actividade da água devem ser mantidos, de modo a garantir a qualidade e segurança dos produtos alimentares. Deste modo, procedeu-se à análise dos filmes preparados, relativamente à permeabilidade ao vapor de água, com o intuito de verificar se a utilização deste tipo de filmes como revestimento de alimentos seria vantajosa (promovendo a redução da transferência de humidade). Os resultados obtidos encontram-se representados na tabela 11 e na figura 7.

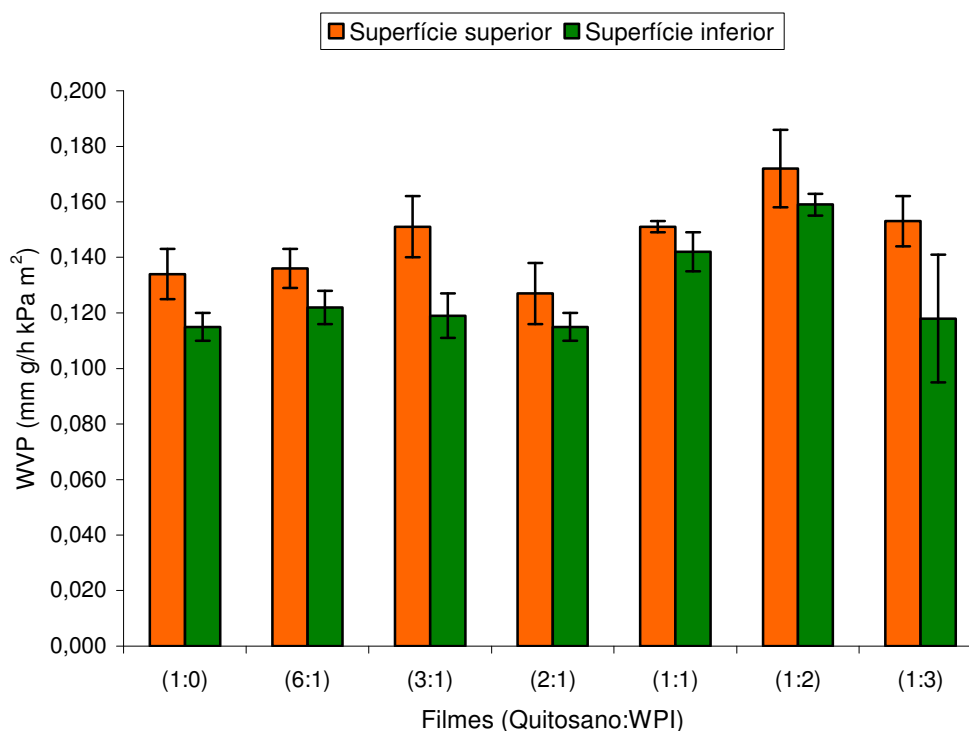
**Tabela 11** – Permeabilidade ao vapor de água da superfície superior e inferior dos filmes de quitosano e WPI nas diferentes proporções

Amostras (Q:WPI)	WVP (mm g/h kPa m <sup>2</sup> )	
	Superfície superior	Superfície inferior
1:0	0,134±0,009	0,115±0,005
6:1	0,136±0,007	0,122±0,006
3:1	0,151±0,011	0,119±0,008
2:1	0,127±0,011	0,115±0,005
1:1	0,151±0,002	0,142±0,007
1:2	0,172±0,014	0,159±0,004
1:3	0,153±0,009	0,118±0,023

Os valores representados correspondem à média de 3 réplicas e respectivos desvios padrão

A determinação deste parâmetro foi efectuada nas duas superfícies dos filmes obtidos: superfície superior (exposta às condições atmosféricas de temperatura e humidade durante a secagem) e inferior (em contacto com a placa de acrílico durante o processo de secagem). A permeabilidade ao vapor de água das duas superfícies dos filmes não foi significativamente influenciada pela presença de proteína até à proporção 2:1 (quitosano:WPI). Nas amostras 1:1 e 1:2 ocorreu o aumento deste parâmetro, tendo este aumento sido mais evidente na superfície inferior. Quanto ao filme com maior quantidade de proteína apenas se verificou o aumento da permeabilidade na superfície superior. Segundo Chen (1995) a permeabilidade ao vapor de água é significativamente afectada pela estrutura dos polímeros que constituem os filmes em análise. Isto porque, polímeros com cadeias lineares conseguem-se empacotar melhor, dando origem a valores de permeabilidade baixos (menor é o tamanho dos poros da matriz). Por outro lado, cadeias poliméricas ramificadas não conseguem interagir tão fortemente entre si, pelo que os valores de permeabilidade ao vapor de água são mais altos. Deste modo, o aumento do WVP verificado em algumas amostras terá sido causado pela introdução de proteína, na matriz de quitosano, em quantidade suficiente para afectar empacotamento das cadeias de quitosano (uma vez que o quitosano é um polímero essencialmente linear e as proteínas são cadeias poliméricas mais volumosas). Logo, a incorporação das proteínas provocou a diminuição da intensidade das interacções entre as cadeias de quitosano, tornando os filmes mais permeáveis. Di Pierro *et al.* (2006) também preparou filmes de quitosano e WPI, tendo constatado que a adição de proteína à matriz de quitosano provocou o aumento de WVP. Este autor menciona que o aumento deste parâmetro, após a adição de

quantidades crescentes de proteína, encontra-se directamente relacionado com o número de grupos polares (grupos laterais dos aminoácidos polares) disponíveis nas cadeias proteicas (-OH, -COOH e -NH<sub>2</sub>). Krochta and Mulder-Johnson, 1997 classificam os filmes relativamente à permeabilidade ao vapor de água, afirmando que filmes com valores de WVP entre 0,004 e 0,4 g mm/m<sup>2</sup> h kPa são barreiras moderadas ao vapor de água. Isto significa que os filmes de quitosano e WPI preparados constituem uma barreira moderada ao vapor de água.



**Figura 7** – Permeabilidade ao vapor de água da superfície superior e inferior dos filmes de quitosano e WPI nas diferentes proporções (quitosano:WPI); as barras de erro representam os desvios padrão correspondentes à média de 3 réplicas

### 3.3.3 Determinação do ângulo de contacto

Procedeu-se à determinação do ângulo de contacto, usando a água como solvente, com o objectivo de verificar a afinidade existente entre cada uma das superfícies dos filmes e a água. É de salientar que quanto maior for o ângulo de contacto menor é a afinidade da superfície em questão para a água e vice-versa. Na tabela 12 e na figura 8 estão representados os resultados obtidos para as duas superfícies dos diferentes filmes preparados.

**Tabela 12** – Ângulos de contacto (usando como solvente a água) da superfície superior e inferior dos filmes de quitosano e WPI nas diferentes proporções

Amostras (Q:WPI)	Ângulo de contacto (°)	
	Superfície superior	Superfície inferior
1:0	97±3	94±4
6:1	102±7	85±3
3:1	113±3	92±6
2:1	110±4	73±4
1:1	109±6	86±13
1:2	88±2	67±8
1:3	93±5	55±12

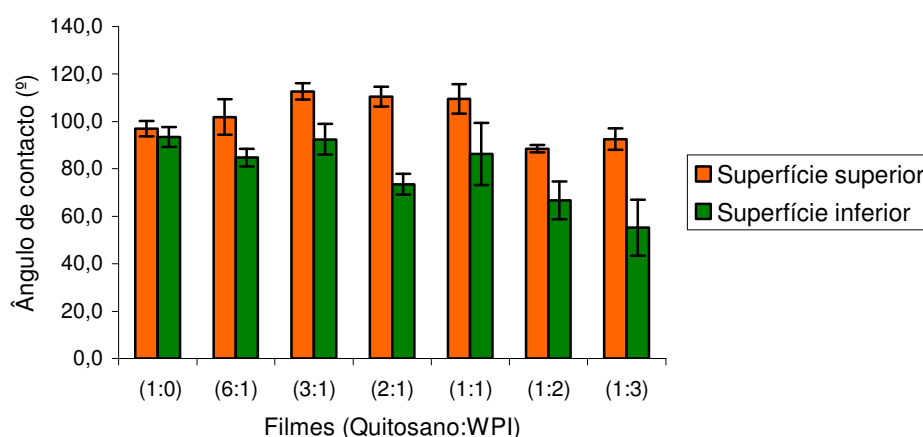
Os valores representados correspondem à média de 10 réplicas e respectivos desvios padrão

Considerando a superfície superior dos filmes preparados pode-se afirmar que, de um modo geral, o ângulo de contacto não sofreu alteração com a adição de proteína à matriz de quitosano.

Relativamente à superfície inferior constatou-se que o ângulo de contacto tende a diminuir com o aumento da quantidade de proteína adicionada à matriz de quitosano. Isto significa que a adição de quantidades crescentes de proteína provocou uma diminuição da hidrofobicidade da superfície inferior dos filmes. Provavelmente, esta diminuição do ângulo de contacto ter-se-á devido à ocorrência de separação de fases, com a consequente acumulação de quitosano na superfície inferior, conforme se demonstrará mais adiante aquando da discussão dos resultados obtidos pela análise espectrofotométrica (FTIR).

Por fim pode-se concluir que a superfície superior dos filmes é mais hidrofóbica do que a superfície inferior.

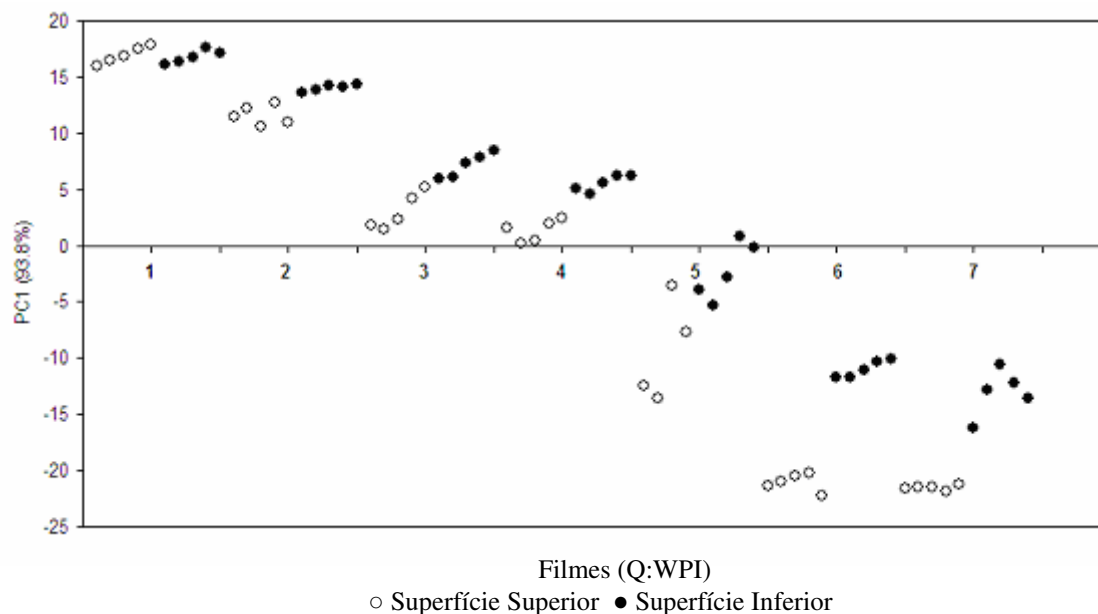




**Figura 8** – Ângulo de contacto, usando a água como solvente, das superfícies superior e inferior dos filmes de quitosano e WPI nas diferentes proporções (quitosano:WPI); as barras de erro representam os desvios padrão correspondentes à média de 10 réplicas

### 3.3.4 Análise por FTIR

Quer por simples observação macroscópica, quer a partir da análise da permeabilidade ao vapor de água e do ângulo de contacto das duas superfícies dos filmes, chegou-se à conclusão que existe um gradiente de composição nos filmes preparados, possivelmente devido à ocorrência de separação de fases entre os dois polímeros, ou seja, cada um dos polímeros estaria predominantemente concentrado numa das duas superfícies, conferindo diferentes propriedades a cada uma das faces do filme. Para confirmar esta hipótese, procedeu-se à análise das duas superfícies por espectroscopia de infravermelho. Os espectros de FTIR foram submetidos a análise em componentes principais (PCA), tendo-se assim obtido o seguinte diagrama de coordenadas factoriais:

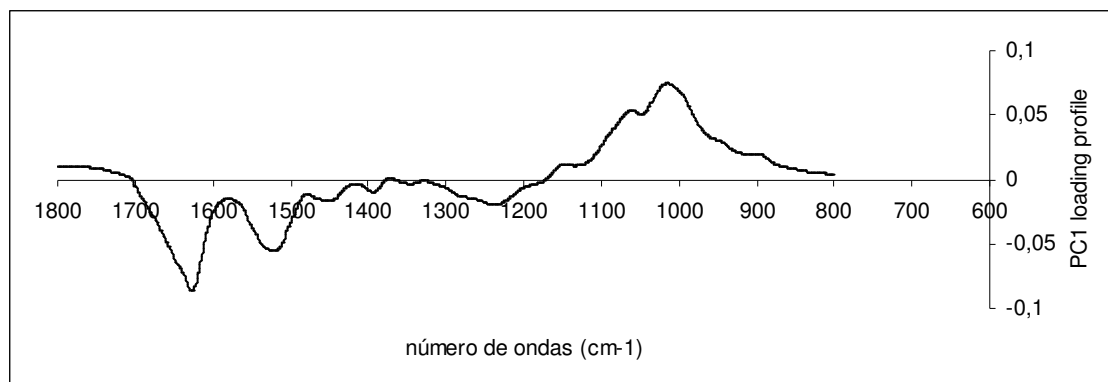


**Figura 9** – Diagrama de coordenadas factoriais de PC1 em função da composição dos filmes de quitosano e WPI

A análise do diagrama de coordenadas factoriais permitiu confirmar que, entre os filmes constituídos por quitosano e WPI, a amostra 6:1 é aquela que contém menor quantidade de proteína e as amostras 1:2 e 1:3 são as que possuem maior quantidade de proteína. É ainda de notar que o filme controlo (1:0) é uma boa referência, uma vez que se verifica no diagrama que a contribuição do quitosano para as duas superfícies é equivalente.

Através da análise deste diagrama, também se consegue fazer uma diferenciação entre as superfícies dos filmes de quitosano e WPI. Isto porque, em todos os casos, verifica-se a ocorrência da separação de fases, ou seja, as superfícies inferiores dos filmes apresentam maior quantidade de quitosano, enquanto que nas superfícies superiores predominam as proteínas.

Na figura 10 encontra-se representado o diagrama de contribuições factoriais dos filmes de quitosano e WPI.



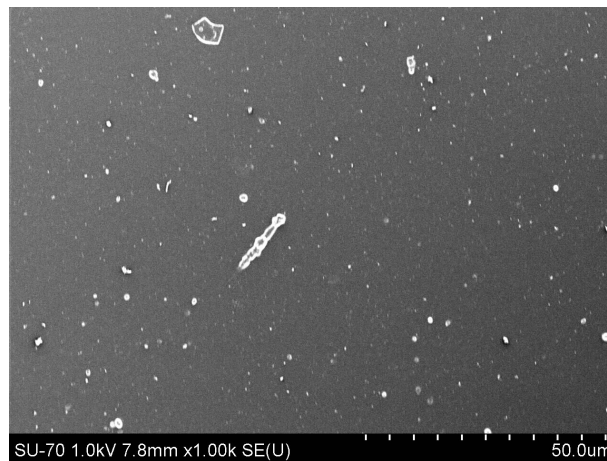
**Figura 10** – Diagrama de contribuições factoriais de PC1 para os filmes de quitosano e WPI preparados

A partir do diagrama de contribuições factoriais pode-se verificar que, de um modo geral, os filmes compostos por quitosano e WPI são caracterizados por uma banda que surge entre 1640 e 1530  $\text{cm}^{-1}$  correspondente às proteínas (parte negativa do diagrama), e outra banda que aparece a 1150-950  $\text{cm}^{-1}$  representativa do polissacarídeo em questão (parte positiva do diagrama). Assim, existe uma maior contribuição da proteína para a composição das amostras que se encontram na parte negativa do diagrama de coordenadas factoriais: 1:1, 1:2 e 1:3; por outro lado, há uma maior contribuição do quitosano para a composição das amostras que surgem na parte positiva do mesmo diagrama: 1:0, 6:1, 3:1, 2:1.

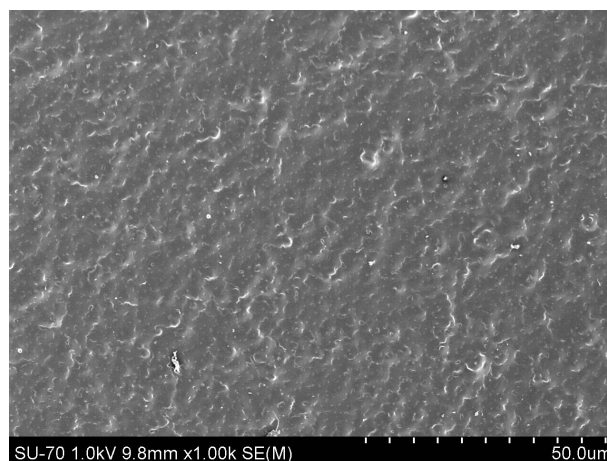
### 3.3.5 Análise por microscopia electrónica de varrimento (SEM)

A microscopia electrónica de varrimento é um tipo de microscopia electrónica em que as imagens da superfície das amostras são obtidas através da incidência de um feixe de electrões. Deste modo, os electrões vão interagir com os átomos que constituem a amostra em questão, dando origem a sinais; estes, por sua vez, fornecem informação acerca da morfologia, composição, entre outras propriedades das amostras.

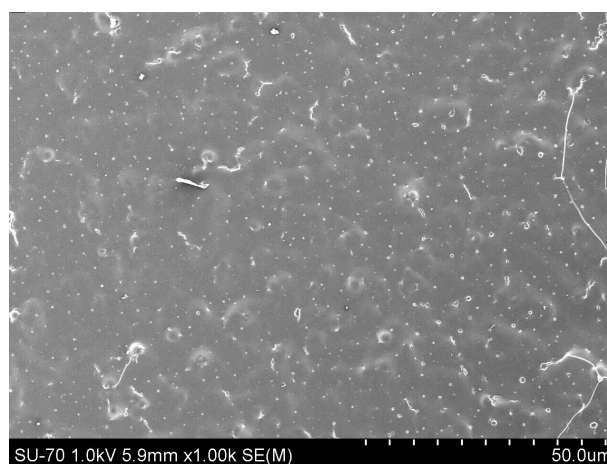
#### *Superfície Superior*



**Figura 11** – Imagem da superfície superior do filme de quitosano e WPI (1:0) obtida através do SEM a 1,0 kV, com uma ampliação 1000x

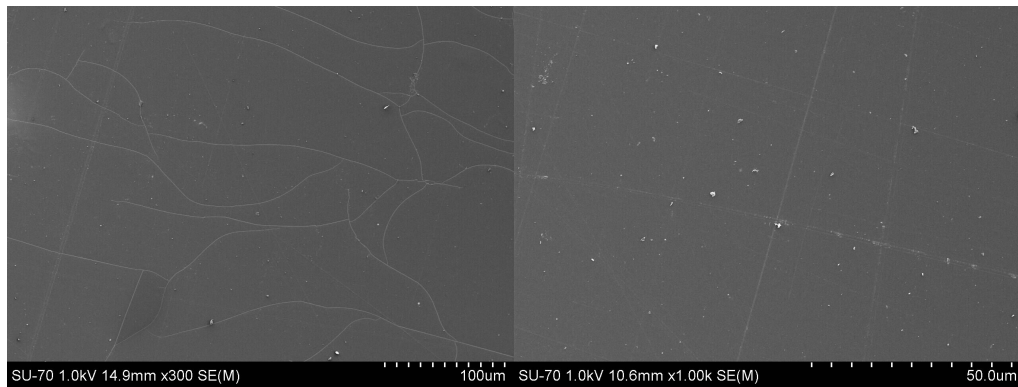


**Figura 12** – Imagem da superfície superior do filme de quitosano e WPI (1:1) obtida através do SEM a 1,0 kV, com uma ampliação 1000x

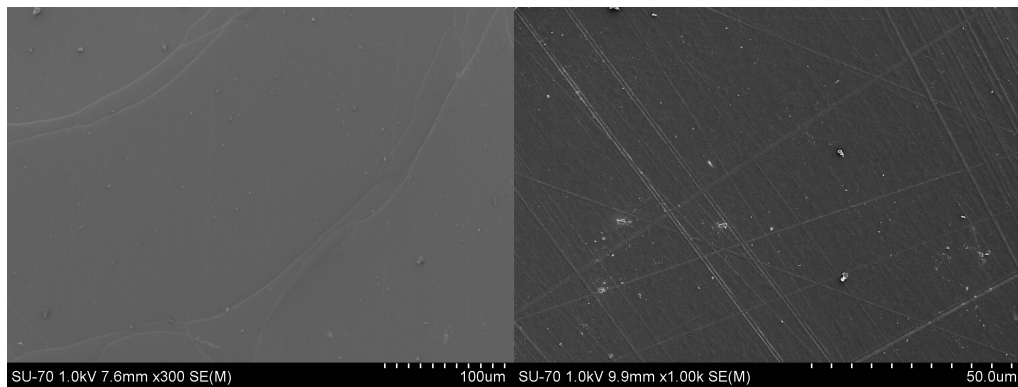


**Figura 13** – Imagem da superfície superior do filme de quitosano e WPI (1:3) obtida através do SEM a 1,0 kV, com uma ampliação 1000x

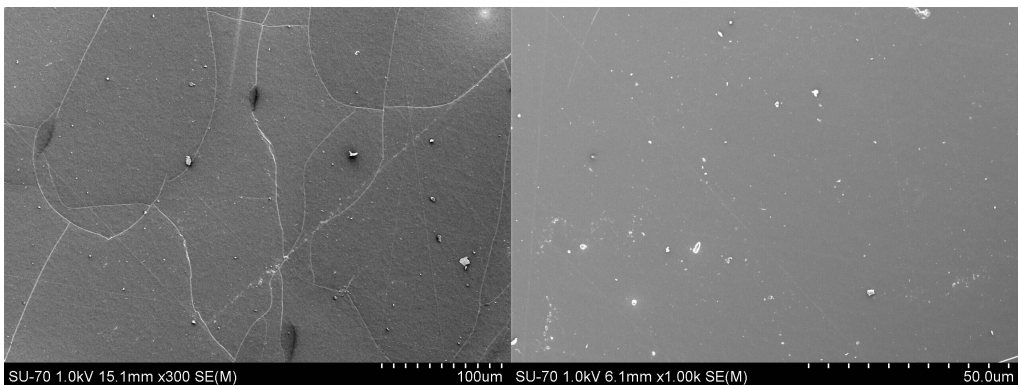
Superfície Inferior



**Figura 14** – Imagens da superfície inferior do filme de quitosano e WPI (1:0) obtidas através do SEM a 1,0 kV, com ampliações 300x (esquerda) e 1000x (direita)

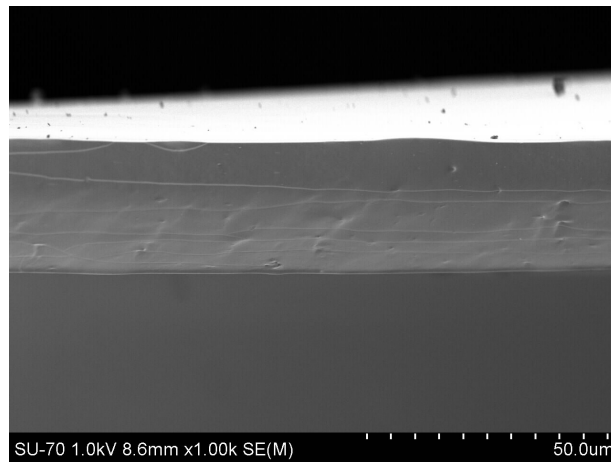


**Figura 15** – Imagens da superfície inferior do filme de quitosano e WPI (1:1) obtidas através do SEM a 1,0 kV, com ampliações 300x (esquerda) e 1000x (direita)

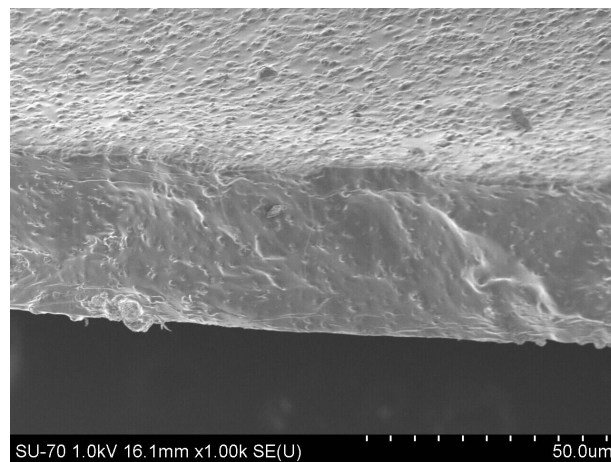


**Figura 16** – Imagens da superfície inferior do filme de quitosano e WPI (1:3) obtidas através do SEM a 1,0 kV, com ampliações 300x (esquerda) e 1000x (direita)

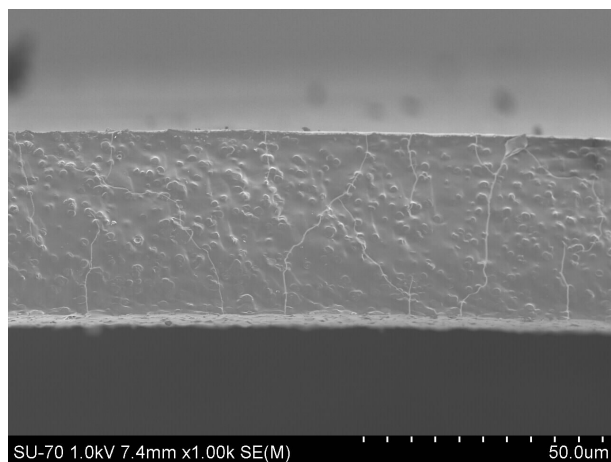
### Secção Transversal



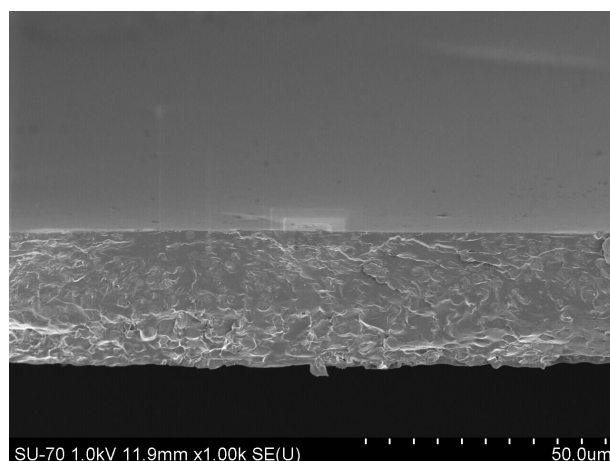
**Figura 17** – Imagem da secção transversal do filme de quitosano e WPI (1:0) obtida através do SEM a 1,0 kV, com uma ampliação de 1000x



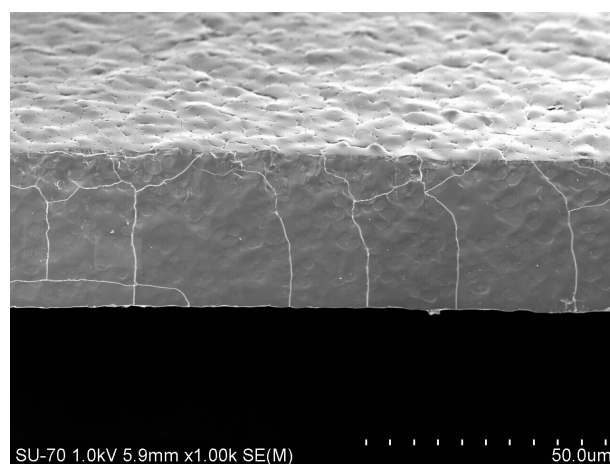
**Figura 18** – Imagem da secção transversal do filme de quitosano e WPI (3:1) obtida através do SEM a 1,0 kV, com uma ampliação de 1000x



**Figura 19** – Imagem da secção transversal do filme de quitosano e WPI (1:1) obtida através do SEM a 1,0 kV, com uma ampliação de 1000x



**Figura 20** – Imagem da secção transversal do filme de quitosano e WPI (1:2) obtida através do SEM a 1,0 kV, com uma ampliação de 1000x



**Figura 21** – Imagem da secção transversal do filme de quitosano e WPI (1:3) obtida através do SEM a 1,0 kV, com uma ampliação de 1000x



De um modo geral, considerando as imagens obtidas pelo SEM para os filmes de quitosano e WPI a pH 3,5, chegou-se à conclusão que a superfície superior dos mesmos apresenta grânulos que conferem uma textura rugosa, enquanto que a superfície inferior é essencialmente lisa. Por outro lado, o filme de quitosano não apresenta diferenças entre as duas superfícies, ou seja, não possui grânulos na sua composição. Através da análise das imagens referentes à secção transversal dos filmes, verificou-se que o filme controlo (1:0) apresenta uma estrutura densa, pouco porosa e sem grânulos, contrariamente aos filmes da mistura. É ainda de referir que no caso dos filmes da mistura, não se observaram diferenças na distribuição dos grânulos pela secção transversal dos filmes com a variação da concentração de proteína.

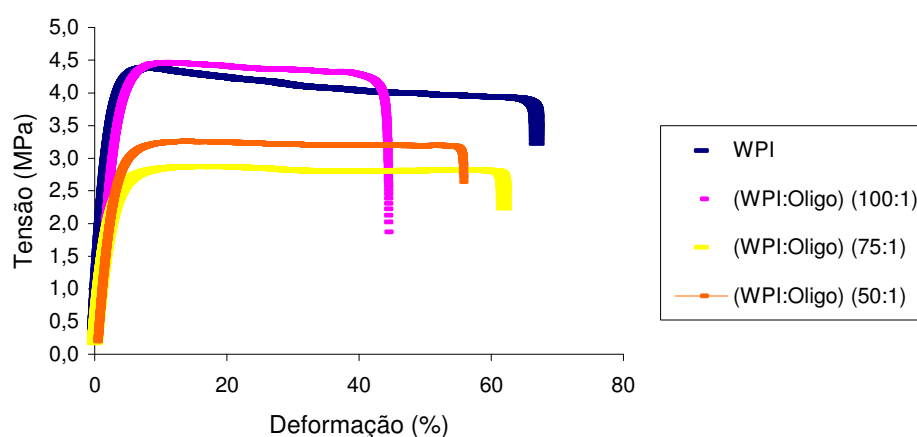
Considerando que através da análise dos filmes por FTIR se chegou à conclusão que ocorre uma separação de fases nos filmes de quitosano e WPI, em que a proteína concentra-se predominantemente na superfície superior dos mesmos, pode-se afirmar que estes grânulos presentes nos filmes da mistura, provavelmente, serão devidos à adição da proteína na matriz de quitosano (a qual provoca instabilidade no sistema). Isto significa que a proteína surge sob a forma de agregados dispersos na matriz de quitosano a pH 3,5, independentemente da concentração.

Para finalizar, pode-se concluir que a morfologia dos filmes da mistura, de um modo geral, não varia com a variação da composição. É também importante referir que todos os filmes analisados, incluindo o controlo, apresentavam fissuras. Este facto, possivelmente, ter-se-á devido à manipulação dos filmes e ao acondicionamento dos filmes num exsiccador até estes serem analisados (o que promoveu a perda de humidade, conduzindo ao aumento da rigidez).

### 3.4 Caracterização dos filmes de WPI e oligoquitosanos a pH 7

#### 3.4.1 Determinação das propriedades mecânicas

Foram efectuados ensaios de tensão com filmes de WPI e oligoquitosanos a pH 7 nas seguintes proporções: 100:1, 75:1 e 50:1. Também se procedeu à análise de um filme constituído apenas por WPI a pH 7, utilizado como referência, já que o objectivo principal desta parte do trabalho foi investigar o efeito que a presença dos oligoquitosanos poderão ter sobre as propriedades dos filmes de WPI. Com este tipo de ensaio obtiveram-se curvas de tensão *versus* deformação, a partir das quais se calcularam os seguintes parâmetros: módulo de Young, tensão e deformação no ponto de ruptura. Neste caso, os filmes analisados não apresentaram um pico de cedência bem definido, uma vez que são mais elásticos do que os filmes de quitosano e WPI a pH 3,5 analisados anteriormente. Na figura 22 estão exemplificadas curvas de tensão *versus* deformação obtidas para os filmes preparados.



**Figura 22** – Curvas de tensão *versus* deformação dos filmes de WPI e oligoquitosanos a pH 7.

Na tabela 13 encontram-se registados os valores referentes aos parâmetros mecânicos e à espessura dos filmes de WPI e oligoquitosanos a pH 7. Os valores obtidos para o filme de WPI (controlo) encontram-se muito próximos dos valores referidos por alguns autores. Por exemplo, segundo Guckian *et al.* (2006), filmes de WPI apresentaram um módulo de Young de 94,4 MPa, tensão no ponto de ruptura de 5,3 MPa e uma percentagem de alongamento de 133,2 %.

**Tabela 13** – Parâmetros mecânicos e espessura dos filmes de WPI e oligoquitosanos nas diferentes proporções.

Amostras (WPI:Oligo)	Módulo de Young (MPa)	Tensão no ponto de ruptura (MPa)	Deformação no ponto de ruptura (%)	Espessura (mm)
(1:0)	129±11	3,6±0,4	67±12	0,087±0,016
(100:1)	140±9	4,1±0,3	43±13	0,082±0,017
(75:1)	99±10	3,0±0,3	67±19	0,092±0,018
(50:1)	95±9	2,8±0,3	56±9	0,081±0,009

Os valores representados correspondem à média de 7 réplicas e respectivos desvios padrão

Através da realização deste tipo de ensaio pode-se concluir que, comparativamente ao controlo (filme de WPI) e apesar dos elevados desvios entre réplicas, apenas a incorporação de oligoquitosanos na matriz proteica nas proporções 75:1 e 50:1 provocou a diminuição significativa do módulo de Young e da tensão no ponto de ruptura; relativamente ao alongamento no ponto de ruptura, verificou-se que este parâmetro não apresentou diferenças significativas. Apesar do reduzido número de diferentes quantidades de oligoquitosanos estudado, parece existir uma tendência para quantidades reduzidas poderem originar filmes mais rígidos e mais quebradiços, diminuindo a rigidez e a tensão de ruptura para quantidades mais elevadas de oligoquitosanos. Isto porque, provavelmente, a incorporação de oligoquitosanos na matriz de proteína acima de uma determinada quantidade promove a diminuição da intensidade das interações entre as cadeias proteicas.

Considerando os parâmetros mecânicos obtidos para os filmes de quitosano/WPI a pH 3,5 e para os filmes de WPI/oligoquitosanos a pH 7, constata-se que estes últimos são

significativamente mais flexíveis e menos rígidos do que os primeiros. Estas propriedades mecânicas são bastante interessantes a nível comercial, dado que um filme deve ser flexível e pouco rígido para que a sua aplicação como revestimento de alimentos seja viável.

### 3.4.2 Determinação da permeabilidade ao vapor de água (WVP)

Procedeu-se à análise da permeabilidade ao vapor de água dos filmes de WPI e oligoquitosanos a pH 7, no sentido de verificar se a incorporação de oligoquitosanos na matriz proteica iria ou não provocar alguma alteração deste parâmetro (tendo um filme de WPI a pH 7 como referência). Na tabela 14 estão registados os valores de WVP obtidos para os filmes em questão. Observando os resultados obtidos, chegou-se à conclusão que a incorporação de oligoquitosanos na matriz proteica não provocou alteração significativa da permeabilidade ao vapor de água, independentemente da concentração adicionada. Assim, pode-se afirmar que a presença de oligoquitosanos nos filmes de WPI, nas concentrações estudadas, não conduziu a nenhuma alteração significativa da estrutura da matriz proteica, nomeadamente no que respeita ao empacotamento das cadeias e à sua porosidade.

**Tabela 14** – Permeabilidade ao vapor de água dos filmes de WPI e oligoquitosanos nas diferentes proporções, tendo o filme de WPI como controlo

Amostras (WPI:Oligo)	WVP (mm g/h kPa m <sup>2</sup> )
1:0	0,74±0,10
100:1	0,71±0,04
75:1	0,79±0,04
50:1	0,66±0,09

Os valores representados correspondem à média de 7 réplicas e respectivos desvios padrão

Comparando estes resultados com os valores de WVP obtidos para os filmes de quitosano e WPI a pH 3,5, chegou-se à conclusão de que os filmes à base de proteína e oligoquitosanos a pH 7 são cerca de sete vezes mais permeáveis ao vapor de água. Provavelmente, os filmes preparados com proteína a pH 7 apresentam maiores valores de WVP porque as cadeias proteicas são mais volumosas do que as cadeias de quitosano, facto que conduz à formação de uma matriz mais porosa. A natureza dos aminoácidos constituintes das proteínas (se possuem ou não grupos laterais polares), pode também ser um factor determinante para a permeabilidade dos filmes à base de WPI.

De acordo com Krochta e Mulder-Johnson (1997), os filmes são considerados como fracas barreiras para o vapor de água para valores de WVP entre 0,4 e 4,2 g.mm/ m<sup>2</sup>.h.kPa, barreiras moderadas para valores de WVP entre 0,004 e 0,4 g.mm/ m<sup>2</sup>.h.kPa e boas barreiras quando apresentam um valor de WVP entre 4x10<sup>-4</sup> e 4x10<sup>-3</sup> g.mm/ m<sup>2</sup>.h.kPa. Logo, pode-se afirmar que os filmes de WPI e oligoquitosanos preparados a pH 7 são consideradas fracas barreiras ao vapor de água, propriedade que não é muito favorável para potenciais revestimentos de queijos. Esta característica poderia ser optimizada através do aumento da concentração de plastificante ou da incorporação de agentes hidrofóbicos, por exemplo, lípidos.

### 3.4.3 Determinação do ângulo de contacto

Efectuou-se a medição dos ângulos de contacto da água com a superfície dos filmes, com o intuito de verificar se a incorporação dos oligoquitosanos na matriz de WPI iria conduzir à alteração do carácter hidrofílico que os caracteriza. Na tabela 15 estão registados os ângulos de contacto obtidos para os filmes de WPI e oligoquitosanos, nas diferentes proporções.

**Tabela 15** – Ângulo de contacto dos filmes de WPI e oligoquitosanos nas diferentes proporções, tendo o filme de WPI como controlo

Amostras (WPI:Oligo)	Ângulo de contacto (°)
1:0	97±5
100:1	93±1
75:1	74±2
50:1	63±1

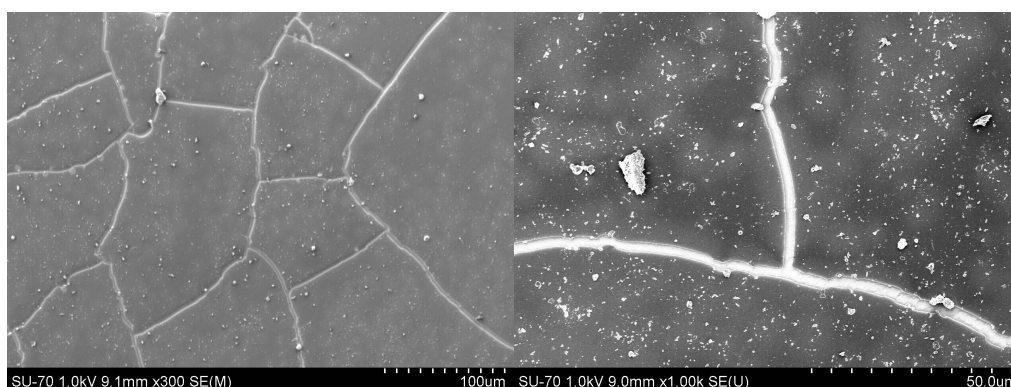
Os valores representados correspondem à média de 7 réplicas e respectivos desvios padrão

Considerando os valores da tabela anterior, pode-se afirmar que o ângulo de contacto sofreu uma diminuição com o aumento da concentração de oligoquitosanos adicionada à matriz de WPI, comparativamente ao filme composto apenas por WPI e plastificante. Esta diminuição do ângulo de contacto com o aumento da concentração de oligoquitosanos, traduz o aumento da afinidade dos filmes para a água (aumento do carácter hidrofílico dos filmes de WPI).

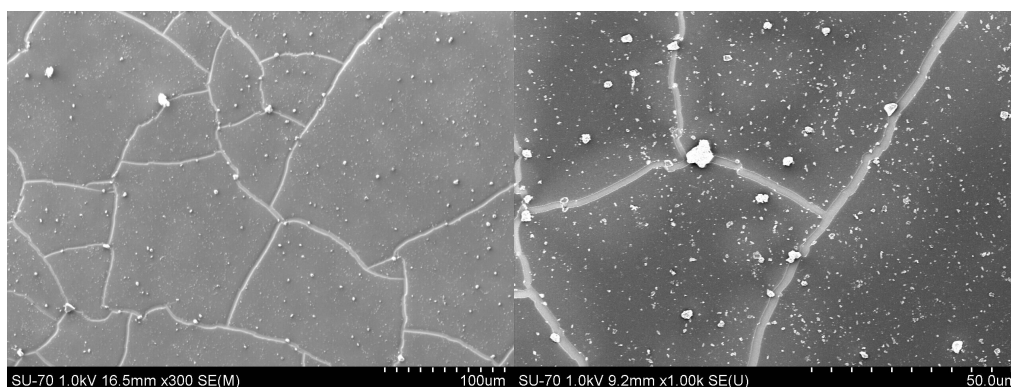
Contudo, é importante salientar que o estudo deste tipo de parâmetros encontra-se bastante condicionado por factores ambientais e experimentais (temperatura e humidade relativa a que decorrem os ensaios, bem como a espessura das amostras e condições de acondicionamento), havendo assim várias potenciais fontes de erro.

### 3.4.4 Análise por microscopia electrónica de varrimento

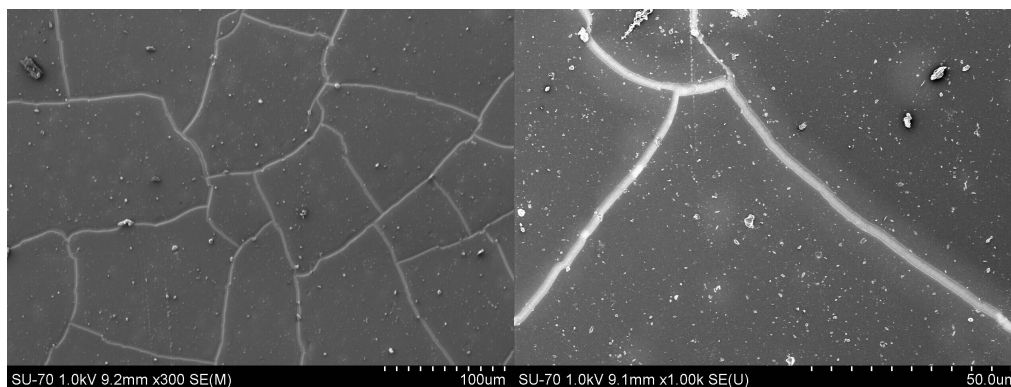
Os filmes de WPI e oligoquitosanos a pH 7 foram analisados por microscopia electrónica de varrimento, com o intuito de se verificar se a morfologia dos mesmos sofria alguma alteração devido à adição de oligoquitosanos à matriz proteica. Nas figuras 23, 24 e 25 estão representadas as imagens obtidas por SEM a diferentes ampliações.



**Figura 23** – Imagens da superfície do filme de WPI obtidas através do SEM a 1,0 kV, com ampliações 300x (esquerda) e 1000x (direita)



**Figura 24** – Imagens da superfície do filme de WPI e oligoquitosanos na proporção (50:1), obtidas através do SEM a 1,0 kV, com ampliações 300x (esquerda) e 1000x (direita)



**Figura 25** – Imagens da superfície do filme de WPI e oligoquitosanos na proporção (100:1), obtidas através do SEM a 1,0 kV, com ampliações 300x (esquerda) e 1000x (direita)

Após a observação das fotos obtidas através do SEM para os filmes de WPI e oligoquitosanos nas diferentes proporções, chegou-se à conclusão que a incorporação de oligoquitosanos não provocou alterações a nível morfológico dos mesmos, independentemente da concentração adicionada, uma vez que não se observam diferenças em relação ao filme de referência. É ainda de salientar que nestas imagens tanto o filme de WPI como os filmes de WPI e oligoquitosanos surgem muito quebrados, facto que não se encontra de acordo com Gounga *et al.* (2007). Estes autores estudaram a morfologia de filmes de WPI (com recurso à microscopia electrónica de varrimento a 10 kV) na presença e ausência de pululanos, tendo chegado à conclusão que o filme constituído apenas por WPI apresentava uma estrutura esponjosa e pouco porosa, na qual surgiam agregados de WPI ligados entre si originando uma rede contínua. No entanto, a presença de pululanos nos filmes de WPI provocou o aumento do número de poros na matriz proteica, tornando-os mais permeáveis ao vapor de água.

Tal como se referiu anteriormente, os filmes de WPI e oligoquitosanos preparados revelaram-se bastante quebradiços nas imagens de SEM. Inicialmente ainda se colocou a hipótese de os filmes poderem ficar danificados durante as análises, devido à incidência do feixe de electrões. Contudo, no estudo realizado pelos autores mencionados anteriormente, as análises dos filmes de WPI e WPI na presença de pululanos foram efectuadas a 10 kV e, nestas condições, as imagens dos filmes não apresentavam fissuras. Logo, esta possibilidade foi colocada de parte uma vez que no presente trabalho as análises foram levadas a cabo a 1 kV.



Tendo em consideração que os filmes foram armazenados durante cerca de 15 dias (em condições de humidade e temperatura controladas) até serem analisados, pensa-se que o carácter quebradiço poderá ser devido ao facto de estes durante o processo de acondicionamento terem perdido humidade, conduzindo à alteração de várias propriedades dos mesmos, nomeadamente, das propriedades mecânicas. Alguns autores fizeram o estudo das propriedades mecânicas e de barreira de filmes de WPI plastificados com glicerol e sorbitol ao longo do tempo, concluindo assim que os filmes plastificados com glicerol sofreram alterações das propriedades mecânicas (mais evidentes nos primeiros 40 dias), tornando-se menos flexíveis e mais rígidos ao longo do tempo (Anker *et al.*, 2001). Esta constatação vai de encontro com o que foi referido acerca do carácter quebradiço dos filmes, verificado nas imagens de SEM.

## ***4. Conclusões***

---

Através da realização deste trabalho experimental, chegou-se à conclusão que não se conseguem formar filmes de WPI e quitosano de massa molecular média a valores de pH superiores ao ponto isoelétrico das proteínas do soro do leite. Isto devido à interacção electrostática entre os dois biopolímeros, que ocorre nestas condições de ionização, o que conduz à formação de complexos insolúveis.

Como alternativa, procedeu-se à formulação e estudo de filmes de quitosano de massa molecular média e WPI a pH ácido, e de filmes de WPI e oligoquitosanos a pH 7. No primeiro caso, verificou-se que não se conseguiam formar filmes de apenas WPI a este pH, isto porque, entre as cadeias proteicas não se estabelecem ligações por pontes dissulfureto em número/intensidade suficiente para valores de pH <6,5, as quais são essenciais para se conseguirem filmes auto-sustentados e com propriedades mecânicas aceitáveis. No segundo caso, embora se conseguissem formar filmes de WPI e oligoquitosanos a pH 7 devido à reduzida massa molecular dos oligoquitosanos, verificou-se um determinado limite na quantidade de oligoquitosanos que se consegue incorporar num filme de WPI sem que verifique a formação de complexos electrostáticos insolúveis.

Com a análise das propriedades mecânicas dos filmes produzidos a pH ácido, concluiu-se que quanto maior for a quantidade de proteína incorporada na matriz de quitosano, menos resistentes e menos flexíveis são os filmes obtidos.

A análise por FTIR revelou que existe um gradiente de composição nos filmes preparados, apresentando a superfície inferior maior quantidade de quitosano, enquanto que na superfície superior predominam as proteínas do soro do leite, indicando a possível separação de fases entre os dois polímeros durante a preparação dos filmes. Esta hipótese foi confirmada por análise microscópica (SEM) a qual revelou claras diferenças morfológicas entre as duas superfícies. A superfície superior dos filmes possui uma textura rugosa, na qual predominam as proteínas do soro do leite, enquanto que a superfície inferior dos mesmos é lisa, na qual se concentra predominantemente o polissacarídeo. Como esperado, este facto reflectiu-se nas propriedades dos filmes, nomeadamente conferindo diferentes características às duas superfícies.

A permeabilidade ao vapor de água das duas superfícies dos filmes não foi significativamente influenciada pela presença de proteína até à proporção 2:1 (quitosano:WPI). Nas amostras 1:1 e 1:2 ocorreu o aumento deste parâmetro, tendo este

aumento sido mais evidente na superfície inferior. Quanto ao filme com maior quantidade de proteína 1:3 apenas se verificou o aumento da permeabilidade na superfície superior.

A incorporação de WPI na matriz de quitosano apenas provocou alteração da hidrofobicidade da superfície inferior dos filmes formados a pH ácido (diminuição da hidrofobicidade com o aumento da concentração de proteína). Relacionando as duas superfícies dos filmes, verificou-se que a superfície superior dos mesmos, aquela mais rica em proteínas mas também aquela mais heterogênea e onde se verifica uma maior separação de fases, é mais hidrofóbica do que a superfície inferior.

Relativamente aos filmes de WPI e oligoquitosanos preparados a pH 7, verificou-se que a incorporação de oligoquitosanos na matriz de WPI melhorou as propriedades mecânicas destes, comparativamente ao filme de referência, pois a presença dos oligoquitosanos promoveu a diminuição da rigidez e da tensão no ponto de ruptura, mantendo constante a deformação no ponto de ruptura. Verificou-se também uma diminuição da hidrofobicidade da superfície dos filmes com a adição dos oligoquitosanos, embora a permeabilidade ao vapor de água não tenha sido significativamente afectada. Por fim, através do estudo da morfologia da superfície dos filmes de WPI e oligoquitosanos, constatou-se que a presença de oligoquitosanos na matriz de proteína não alterou a morfologia dos mesmos.

Fazendo uma análise global do trabalho realizado, pensa-se que a aplicação dos filmes de WPI e oligoquitosanos como potenciais revestimentos de alimentos, por exemplo queijos, será mais viável e vantajoso (do que os filmes preparados a pH ácido), embora sejam considerados fracas barreiras para o vapor de água e mais hidrofílicos do que o filme de referência. No entanto, esta característica poderá ser optimizada através do aumento da concentração de plastificante ou da incorporação de agentes hidrofóbicos como, por exemplo, lípidos.



## ***5.Referências Bibliográficas***

---

Agulló, E., Rodríguez, M. S., Ramos, V. e E Albertengo, L. (2003) Present and Future Role of Chitin and Chitosan in Food. *Macromolecular Bioscience*, 3: 521-530.

Ahvenainen, R. (2003) Novel Food Packaging Techniques. *Woodhead Publishing Food*, 4: 50-70.

Anker, M., Stading, M. e Hermansson, A. (1998) Mechanical Properties, Water Vapor Permeability, and Moisture Contents of  $\beta$ -Lactoglobulin and Whey Protein Films Using Multivariate Analysis. *Journal Agriculture of Food Chemistry*, 46: 1820-1829.

Anker, M., Stading, M. e Hermansson, A. (2001) Aging of Whey protein films and the effect on mechanical and barrier properties. *Journal Agriculture of Food Chemistry*, 49: 989-995.

Butler, B. L., Vergano, P. J., Testin, R. F., Bunn, J. M. e Wiles, J. L. (1996) Mechanical and barrier properties of edible films of chitosan films as affected by composition and storage. *Journal of Food Science*, 61: 953-955, 961.

Cabrera, J. C. e Cutsem, P. V. (2005) Preparation of Chitooligosaccharides with degree of polymerization higher than 6 by acid or enzymatic degradation of chitosan. *Biochemical Engineering Journal*, 25: 165-172.

Cagri, A., Ustunol, Z. e Ryser, E. T. (2001) Antimicrobial, Mechanical, and Moisture Barrier Properties of Low pH Whey Protein-based Edible Films Containing p-Aminobenzoic or Sorbic Acids. *Journal of Food Science*, 66: 865-870.

Cha, D. S. e Chinnan, M. S. (2004) Biopolymer-Based Antimicrobial Packaging: A review. *Food Science and Nutrition*, 44: 223-237.

Chen, H. (1995) Functional Properties and Applications of Edible Films Made of Milk Proteins. *Journal of Dairy Science*, 78: 2563-2583.

Chen, Y., Chung, Y., Wang, L., Chen, K. e Li, S. (2002) Antimicrobial properties of chitosan in waterborne pathogen. *Journal of Environmental Science and Health*, 37: 1379-1390.

Ciesla, K., Salmieri, S. e Lacroix, M. (2006) Modification of the properties of milk protein films by gamma radiation and polysaccharide addition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86: 908-914.

Covas, C. A. P. (2006) Estudos sobre Quitina y Quitosana. Tese de Doutorado Faculdade de Química da Universidade de Havana, 2: 11-12.

Debeaufort, F., Quezada-Gallo, J. e Voilley, A. (1998) Edible Films and Coatings: Tomorrows Packaging. *Critical Reviews in Food Science*, 4: 299-313.

Di Pierro, P., Chico, B., Villalonga, R., Mariniello, L., Damaio, A. E., Masi, P. e Porta, R. (2006) Chitosan-Whey Protein Edible Films Produced in the Absence or Presence of Transglutaminase: Analysis of Their Mechanical and Barrier Properties. *Biomacromolecules*, 7: 744-749.

Di Pierro, P., Chico, B., Villalonga, R., Mariniello, L., Masi, P. e Porta, R. (2007) Transglutaminase-catalyzed preparation of chitosan-ovalbumin films. *Enzyme and Microbial Technology*, 40: 437-441.

Gennadios, A. (2002) Protein-Based Films and Coatings. CRC Press. New York. 6: 159-180.

Gennadios, A. (2002a) Protein-Based Films and Coatings. CRC Press. New York. 1: 1-42.

Guckian, S., Dwyer, C., O'Sullivan, M., O'Riordan, E. D. e Monahan, F. J. (2006) Properties of and mechanisms of protein interactions in films formed from different proportions of heated and unheated whey protein solutions. *European Food Research and Technology*, 223: 91-95.



- Gounga, M. E., Xu, S. e Wang, Z. (2007) Whey protein isolate-based films as affected by protein concentration, glycerol ratio and pullulan addition in film formation. *Journal of Food Engineering*, 83: 521-530.
- Hirano, S. (1999) Chitin and Chitosan as novel biotechnological materials. *Polymer International*, 48: 732-734.
- Huang, R., Mendis, E., Rajapakse, N. e Kim, S. (2006) Strong electronic charge as an important factor for anticancer activity of chitooligosaccharides (COS). *Life Sciences*, 78: 2399-2408.
- Jeon, Y., Shahidi, F. e Kim, S. (2000) Preparation of chitin and chitosan oligomers and their applications in physiological functional foods. *Food Reviews International*, 16: 159-176.
- Kester, J. J. e Fennema, O. R. (1986) Edible Films and Coatings: A Review. *Food Technology*, 40: 47-59.
- Khwalidia, K., Perez, C., Banon, S., Desobry, S., e Hardy, J. (2000) Milk Proteins for Edible Films and Coatings. *Food Science and Nutrition*, 44: 239-251.
- Kim, S. e Rajapakse, N. (2005) Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. *Carbohydrate Polymers*, 62: 357-368.
- Krochta, J. M. e Mulder-Johnson, C. (1997) Edible and Biodegradable Polymer Films: Challenges and Opportunities. *Food technology*, 51: 61-74.
- Kumar, M. N. V. R. (2000) A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers*, 46: 1-27.
- Kurita, K. (2006) Chitin and Chitosan: Functional Biopolymers from Marine Crustaceans. *Marine Biotechnology*, 8: 203-226.

Li, J., Du, Y., e Liang, H. (2007) Influence of molecular parameters on the degradation of chitosan by a commercial enzyme. *Polymer Degradation and Stability*, 92: 515-524.

Liu, N., Chen, X., Park, H., Liu, C., Meng, X. e Yu L. (2006) Effect of MW and concentration of chitosan on antibacterial activity of *Escherichia coli*. *Carbohydrate Polymers*, 64: 60-65.

Miller, K. S. e Krochta, J. M. (1997) Oxygen and aroma barrier properties of edible films: A Review. *Trends in Food Science & Technology*, 8: 228-237.

Nielsen, L. E. e Landel, R. F. (1994) Mechanical Properties of Polymers and Composites. Marcel Dekker. New York. 1: 6-9.

Park, P., Je, J. e Kim, S. (2003) Free Radical Scavenging Activity of Chitooligosaccharides by Electron Spin Resonance Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 4624-4627.

Peniche, C., Arguelles, W. e San Román, J. (1993) Estudio comparativo sobre la degradación térmica de la quitosana y de un derivado mercaptano de la quitosana. I Experimentos dinámicos. Quimindustria'93. Habana.

Peniche, C., Arguelles, W. e San Román, J. (1993a) Estudio comparativo sobre la degradación térmica de la quitosana y de un derivado mercaptano de la quitosana. II Experimentos isotérmicos. Quimindustria'93. Habana.

Pérez-Gago, M. B. e Krochta, J. M. (2002) Protein based Films and Coatings. *CRC Press*, 6: 159-180.

Phillips, G. O. e Williams, P. A. H. (2000) Handbook of hydrocolloids. *Woodhead Publishing in Food Science and Technology*, 11: 189-218.

Prodpran, T., Benjakul, S. e Artharn, A. (2007) Properties and microstructure of protein-based film from round scad (*Decapterus maruadsi*) muscle as affected by palm oil and chitosan incorporation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 41: 605-614.

Rhim, J. W. e NG, P. K. W. (2007) Natural Biopolymer-Based Nanocomposite Films for Packaging Applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47: 411-433.

Rhim, J. W., Weller, C. L. e Ham, K. S. (1998) Characteristics of chitosan films as affected by type solvent acid. *Food Science Biotechnology*, 7: 263-268.

Robertson, G. (2006) Food Packaging: principles and practice. CRC Press. Cap.1. pag.3.

Robertson, G., L. (1993) Food Packaging: Principles and Practice. Marcel Dekker. New York.

Santos, C. A. N. S. (2006) Propriedades de Filmes de Quitosano-Influência do grau de acetilação e da massa molecular do biopolímero. Tese de Mestrado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, 1:16-20.

Santos, C., Seabra, P., Veleirinho, B., Delgadilho, I. e Lopes da Silva, J. A. (2006) Acetilation and molecular mass effects on barrier and mechanical properties of shortfin squid chitosan membranes. *European Polymer Journal*, 42: 3277-3285.

Shahidi, F., Arachchi, J. K. V. e Jeon, Y. (1999) Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Science & Technology*, 10: 37-51.

Tharanathan, R. N. (2003) Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Food Science & Technology*, 14: 71-78.

Wang, L., Liu, L., Holmes, J., Kerry, J. F. e Kerry, J. P. (2007) Assessment of folm-forming potential and properties of protein and polysaccharide-based biopolymer films. *International Journal of Food Science and Technology*, 42: 1128-1138.

Wang, P., Jiang, X., Jiang, Y., Hu, X., Mou, H., Li, M. e Guan, H. (2007) In vitro antioxidative activities of three marine oligosaccharides. *Natural Product Research*, 21: 646-654.

Xing, R., Liu, S., Guo, Z., Yu, H., Wng, P., Li, C. e Li, P. (2005) Relevance of molecular weight of chitosan and its derivatives and their antioxidant activities in vitro. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13: 1573-1577.